

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

25. 6. 2004

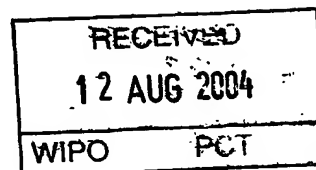
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   8 月   7 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 2 8 9 4 6 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [J P 2 0 0 3 - 2 8 9 4 6 9]

出   願   人      独立行政法人産業技術総合研究所  
Applicant(s):

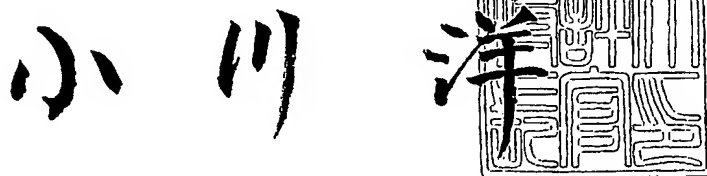


BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   7 月 3 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office



【書類名】 特許願  
【整理番号】 J103624274  
【提出日】 平成15年 8月 7日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61B 10/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術  
                                総合研究所 関西センター尼崎事業所内  
    【氏名】 三宅 正人  
【発明者】  
    【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術  
                                総合研究所 関西センター尼崎事業所内  
    【氏名】 吉川 智啓  
【発明者】  
    【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術  
                                総合研究所 関西センター尼崎事業所内  
    【氏名】 三宅 淳  
【特許出願人】  
    【識別番号】 301021533  
    【氏名又は名称】 独立行政法人 産業技術総合研究所  
【代理人】  
    【識別番号】 100078282  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 山本 秀策  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100062409  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 安村 高明  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100113413  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 森下 夏樹  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003-181915  
    【出願日】 平成15年 6月25日  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1



**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを生成する方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；および

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；  
を包含する、方法。

**【請求項 2】**

前記生物学的因子は、核酸分子または該核酸分子に由来する分子である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および b) 塩、を含む、組成物によって、前記支持体に固定される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記細胞には、アクチン作用物質が提供される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および b) 塩、を含む、組成物によって、前記支持体に固定され、かつ、アクチン作用物質が提供される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記生物学的因子は、核酸分子、タンパク質、糖鎖、脂質、低分子、それらの複合分子からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記細胞は、モニター前に少なくとも約 3 日間培養される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記生物学的因子は、遺伝子をコードする核酸分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記プロファイルは、遺伝子発現のプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記プロファイルは、アポトーシスシグナルのプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記プロファイルは、ストレスシグナルのプロファイルである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記プロファイルは、分子の局在化に関するプロファイルである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記分子は、蛍光、燐光、放射性物質またはその組み合わせにて標識される、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記プロファイルは、細胞形態の変化を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記プロファイルは、プロモーターのプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含み、前記特定薬剤を投与するさらに工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 18】**

外来因子が前記細胞に提供される工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記外来因子は、RNA i を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記外来因子は、生体に存在しない化学物質を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記プロファイルは、分子間相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記外来因子は、前記細胞のレセプターに対するリガンドを含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記プロファイルは、レセプターリガンド相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記プロファイルは細胞形態であり、前記方法は、遺伝子の過剰発現、過小発現もしくはノックダウン、外来因子の添加および環境の変化からなる群より選択される、刺激を該細胞に与える工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記プロファイルは、前記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記方法は、ツーハイブリッド法、FRET および BRET からなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記プロファイルは、前記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含み、前記方法は、ツーハイブリッド法、FRET および BRET からなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記細胞は、前記支持体上にアレイ状に配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記細胞は、前記支持体上にアレイ状に配置され、前記複数の細胞は、各々が最大 1 mm の間隔をあけて配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記プロファイルはリアルタイムに得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記細胞を固相支持体に固定する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記データは、前記プロファイルに関する情報を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記データは、前記モニターにおける条件に関する情報を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記データは、前記細胞の状態に関する情報を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも 2 種の生物学的因子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも 3 種の生物学的因子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも 8 種の生物学的因子を含む、請求項 1 に

記載の方法。

【請求項 38】

生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 39】

前記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】

前記支持体は、固相支持体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 41】

前記支持体は、基板を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 42】

前記生物学的因子は核酸分子であり、前記細胞は、該核酸分子でトランスフェクトされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 43】

前記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記トランスフェクトは固相上で行われる、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

前記プロファイルの位相を比較する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 46】

前記細胞のプロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 47】

前記プロファイルは、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理により処理される工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 48】

複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを提示方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および

c) 該データを提示する工程、

を包含する、方法。

【請求項 49】

前記提示はリアルタイムである、請求項 48 に記載の提示方法。

【請求項 50】

前記提示は、視覚で感知されるように行われる、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

前記提示は、聴覚で感知されるように行われる、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 52】

同一環境にある細胞の状態を判定する方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および

c) 該データから該細胞の状態を判定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 53】

前記プロファイルと前記細胞の状態とを予め関連付ける工程をさらに包含する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記細胞は、状態が既知の細胞を含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 55】

前記生物学的因子は、少なくとも2種存在する、請求項52に記載の方法。

【請求項56】

前記生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、請求項52に記載の方法。

【請求項57】

前記データは、リアルタイムで生成される、請求項52に記載の方法。

【請求項58】

前記状態は、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期および増殖状態からなる群より選択される、請求項52に記載の方法。

【請求項59】

前記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、請求項52に記載の方法。

【請求項60】

前記固相支持体は、基板を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項61】

前記生物学的因子は核酸分子であり、前記細胞は該核酸分子でトランスフェクトされる、請求項52に記載の方法。

【請求項62】

前記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

前記生物学的因子は、他の生物学的因子に結合する能力を有する、請求項52に記載の方法。

【請求項64】

前記判定工程c)は、前記プロファイルの位相を比較することを包含する、請求項52に記載の方法。

【請求項65】

前記判定工程c)は、前記プロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、請求項52に記載の方法。

【請求項66】

前記判定工程c)は、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理を包含する、請求項52に記載の方法。

【請求項67】

外来因子と、該外来因子に対する細胞の応答とを相関付ける方法であって、

a) 細胞を、複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上で、外来因子に曝露する工程；

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および

c) 該外来因子と、該プロファイルとを相関付ける工程；

を包含する、方法。

【請求項68】

前記細胞は、前記支持体に固定される、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

少なくとも2つの前記外来因子を使用して、各外来因子に対するプロファイルを得る工程をさらに包含する、請求項67に記載の方法。

【請求項70】

少なくとも2つの前記プロファイルを類別することにより、該プロファイルに対応する外来因子を類別する工程をさらに包含する、請求項67に記載の方法。

【請求項71】

前記プロファイルは、リアルタイムで提示される、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記細胞は、アレイ上で培養される、請求項67に記載の方法。

【請求項73】

前記工程 (b) におけるプロファイルのモニターは、前記アレイから画像データを得ることを包含する、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 74】

前記 (c) における前記外来因子と前記プロファイルとを相関付ける工程は、前記プロファイルの位相の異同を識別する工程である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 75】

前記外来因子は、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧からなる群から選択される、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 76】

前記化学物質は、生体分子、化学合成物または培地である、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

前記生体分子は、核酸分子、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リボプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンからなる群から選択される、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記生体分子は、ホルモン、サイトカイン、細胞接着因子および細胞外マトリクスからなる群より選択される少なくとも 1 つの生体分子を含む、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 79】

前記化学物質は、レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 80】

細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法であって、

- a) 細胞に、同一環境を保つことができる支持体上で、複数の既知の外来因子を曝露する工程；
  - b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターし、既知の外来因子の各々に対する該細胞のプロファイルを得て該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；
  - c) 該既知の外来因子の各々と、該プロファイルの各々とを相関付ける工程；
  - d) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；
  - e) 外来因子に曝露された該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する該細胞のプロファイルを得る工程；
  - f) 該工程 (b) で得られたプロファイルの中から、該工程 (e) で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；および
  - g) 該未同定の外来因子は、該工程 (f) において決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子であることを決定する工程；
- を包含する、方法。

【請求項 81】

細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法であって、

- a) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、該既知の外来因子に対応する該細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する工程；
- b) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；
- c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、該細胞のプロファイルを得る工程；
- d) 該工程 (a) において提供された、該プロファイルの中から、該工程 (c) において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；および
- e) 該未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子で

あることを決定する工程；  
を包含する、方法。

【請求項 82】

複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを得る方法であって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；および
  - b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルを得る工程、
- を包含する、方法。

【請求項 83】

請求項 1 に記載の方法によつて生成されたデータが格納される記録媒体。

【請求項 84】

前記記録媒体は、前記モニターにおける条件に関する情報、前記プロファイルに関する情報、前記細胞の状態に関する情報および前記生物学的因子に関する情報からなる群より選択される、少なくとも 1 つの情報に関するデータをさらに含む、請求項 83 に記載の記録媒体。

【請求項 85】

前記データは、互いにリンクされた形態で格納される、請求項 84 に記載の記録媒体。

【請求項 86】

前記データは、前記細胞ごとにリンクされて格納される、請求項 84 に記載の記録媒体。

【請求項 87】

請求項 1 に記載された方法によつて生成されたデータ。

【請求項 88】

請求項 1 に記載された方法によつて生成されたデータを含む伝送媒体。

【請求項 89】

同一環境にある複数の細胞の情報に関するプロファイルデータを生成するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；および
  - c) 該モニター手段から得られた信号から該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；
- を備える、システム。

【請求項 90】

複数の細胞をさらに含み、該複数の細胞は前記支持体に固定される、請求項 89 に記載のシステム。

【請求項 91】

前記支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの物質が付着される、請求項 90 に記載のシステム。

【請求項 92】

前記モニター手段は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干渉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラからなる群より選択される少なくともひとつの手段を含む、請求項 89 に記載のシステム。

【請求項 93】

複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを提示するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
- b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
- c) 該モニター手段から得られた信号から該細胞のプロファイルのデータを生成する手

段; および

d) 該データを提示する手段、  
を備える、システム。

【請求項 94】

複数の細胞をさらに含み、該複数の細胞は前記支持体に固定される、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 95】

前記支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの物質が付着される、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 96】

前記モニター手段は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干渉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラからなる群より選択される少なくともひとつの手段を含む、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 97】

前記データを提示する手段は、ディスプレイである、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 98】

前記データを提示する手段は、スピーカである、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 99】

細胞の状態を判定するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体;
- b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段;
- c) 該モニター手段から得られた信号からデータを生成する手段; および
- d) 該データから該細胞の状態を外挿する手段、  
を備える、システム。

【請求項 100】

外来因子と、該外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体;
- b) 外来因子を曝露する手段;
- c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段;
- d) 該モニター手段からの信号から、該細胞のプロファイルのデータを生成する工程; および
- e) 該外来因子と、該プロファイルとを相関付ける手段;  
を備える、システム。

【請求項 101】

細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体;
- b) 既知の外来因子を曝露する手段;
- c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段;
- d) 外来因子の各々に対する該細胞のプロファイルを得て該細胞のプロファイルのデータを生成する手段;
- e) 該既知の外来因子の各々と、該プロファイルの各々とを相関付ける手段;
- f) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する手段;
- g) 該手段 (d) で得られた既知の外来因子のプロファイルと、未知の外来因子のプロファイルとを比較し、既知の外来因子のプロファイルの中から、未知の外来因子のプロフ

ファイルに対応するプロファイルを決定する手段であって、該決定された未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子である、手段、を備える、システム。

【請求項 1 0 2】

細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムであって、

a) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、該既知の外来因子に対応する該細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータが格納された記録媒体；

b) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；

c) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；

d) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；

e) 該モニター手段から得られた信号から、該細胞のプロファイルを得る手段；

f) 該記録媒体 (a) において格納される該プロファイルの中から、未知の外来因子に関して得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手段であって、該未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子である、手段；を備える、システム。

【請求項 1 0 3】

複数の細胞を固定し得、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体。

【請求項 1 0 4】

前記支持体上の細胞は、アレイ状に配置され得る、請求項 1 0 3 に記載の支持体。

【請求項 1 0 5】

塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体、またはアクチン作用物質を含む、請求項 1 0 3 に記載の支持体。

【請求項 1 0 6】

塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体、ならびにアクチン作用物質を含む、請求項 1 0 3 に記載の支持体。

【請求項 1 0 7】

前記細胞は、最大 1 mm 以下の間隔で配置され得る、請求項 1 0 3 に記載の支持体。

【請求項 1 0 8】

固定された細胞をさらに含む、請求項 1 0 3 に記載の支持体。

【請求項 1 0 9】

固定された生物学的因子をさらに含む、請求項 1 0 4 に記載の支持体。

【請求項 1 1 0】

前記生物学的因子は 2 種類以上固定される、請求項 1 0 9 に記載の支持体。

【請求項 1 1 1】

細胞および生物学的因子が固定される、請求項 1 0 3 に記載の支持体。

【請求項 1 1 2】

塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともに固定される、請求項 1 0 3 に記載の支持体。

【請求項 1 1 3】

塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともにアレイ状に固定される、請求項 1 0 3 に記載の支持体。

【請求項 1 1 4】

塩と、遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、核酸分子と、細胞とがアレイ状に固定される、請求項 1 0 4 に記載の支持体。

【請求項 1 1 5】

前記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、H E P E S、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシ



ウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される塩を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 116】

前記遺伝子導入試薬は、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウム、オリゴフェクタミンおよびオリゴフェクターからなる群より選択される少なくともひとつの試薬を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 117】

前記アクチン作用物質は、フィブロネクチン、ラミニンおよびビトロネクチンからなる群より選択される少なくともひとつのタンパク質またはその改変体もしくはフラグメントを含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 118】

前記核酸分子は、サイトカイン、ホルモン、細胞接着因子、細胞骨格タンパク質および酵素からなる群より選択されるタンパク質をコードする配列を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 119】

前記細胞は、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、細菌細胞および真菌細胞からなる群より選択される細胞を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 120】

前記支持体の材料は、ガラス、シリカ、およびプラスチックからなる群より選択される材料を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 121】

固定された複数の細胞を含み、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する方法であって、

A) 支持体を提供する工程；および

B) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて該支持体上に固定する工程、を含む、方法。

【請求項 122】

前記固定工程は、前記塩と、前記正に荷電した物質としての遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、前記負に荷電した物質としての核酸分子と、前記細胞との混合物を、アレイ状に固定することを含む、請求項 121 に記載の方法。

【請求項 123】

前記固定工程は、プリント工程を含む、請求項 121 に記載の方法。

【請求項 124】

前記支持体の提供は、支持体材料から該支持体を作製する工程を包含する、請求項 121 に記載の方法、。

【請求項 125】

固定された複数の細胞を含み、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する装置であって、

A) 支持体を提供する手段；および

B) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて該支持体上に固定する手段を備える、装置。

【請求項 126】

前記固定手段は、プリント手段を含む、請求項 125 に記載の装置。

【請求項 127】

前記支持体提供手段は、支持体材料から前記支持体を成型する手段を含む、請求項 125 に記載の装置。

【請求項 128】

デジタル細胞を生産する方法であって、

- a) 実験対象の細胞を特定する細胞パラメータを取得する工程;
  - b) 該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータを取得する工程;
  - c) 該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータを取得する工程;
  - d) 該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果を取得する工程;
  - e) 該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータと該刺激応答結果とを関連づけることにより、該細胞に対する1つの実験データを生成する工程; および
  - f) 工程 a) ~ 工程 e) を必要に応じて繰り返すことにより、該細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合を生成し、該少なくとも1つの実験データの集合をデジタル細胞として提供する工程;
- を包含する、方法。

**【請求項 129】**

前記環境パラメータは、前記細胞を培養する培地を示すパラメータと、前記培地の条件を示すパラメータとを含む、請求項 128 に記載の方法。

**【請求項 130】**

前記刺激パラメータは、レポーターを示すパラメータと、化学刺激を示すパラメータとを含む、請求項 128 に記載の方法。

**【請求項 131】**

前記刺激応答結果は、前記細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターすることによって得られる該細胞のプロファイルのデータを含む、請求項 128 に記載の方法。

**【請求項 132】**

前記方法は、前記デジタル細胞をデータベースに格納する工程をさらに包含する、請求項 128 に記載の方法。

**【請求項 133】**

デジタル細胞を生産する装置であって、

- a) 実験対象の細胞を特定する細胞パラメータを取得する手段;
  - b) 該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータを取得する手段;
  - c) 該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータを取得する手段;
  - d) 該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果を取得する手段;
  - e) 該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータと該刺激応答結果とを関連づけることにより、該細胞に対する1つの実験データを生成する手段; および
  - f) 工程 a) ~ 工程 e) を必要に応じて繰り返すことにより、該細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合を生成し、該少なくとも1つの実験データの集合をデジタル細胞として提供する手段;
- を備えた、装置。

**【請求項 134】**

サービスリクエストとサービスプロバイダとを含むコンピュータシステムを用いて、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供する方法であって、

少なくとも1つのデジタル細胞を格納したデータベースを用意する工程であって、該少なくとも1つのデジタル細胞のそれぞれは、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合によって表現されており、該少なくとも1つの実験データのそれぞれは、

該細胞を特定する細胞パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータと、該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果とを含む、工程；

該サービスリクエストが、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを受け取り、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを含むリクエストを生成する工程；

該サービスリクエストが、該リクエストを該サービスプロバイダに提供する工程；

該サービスプロバイダが、該リクエストに回答して該データベースを検索し、該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する工程；

該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在すると決定された場合には、該サービスプロバイダが、該刺激応答結果を該サービスリクエストに提供する工程；および

該サービスリクエストが、該刺激応答結果を表示する工程；

を包含する、方法。

#### 【請求項 135】

サービスリクエストと複数のサービスプロバイダとを含むコンピュータシステムを用いて、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供する方法であって、

少なくとも1つのデジタル細胞をそれぞれ格納した複数のデータベースを用意する工程であって、該少なくとも1つのデジタル細胞のそれぞれは、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合によって表現されており、該少なくとも1つの実験データのそれぞれは、該細胞を特定する細胞パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータと、該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果とを含む、工程；

該複数のサービスプロバイダが提供可能な少なくとも1つのサービスを登録したサービスレジストリを用意する工程；

該サービスリクエストが、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを受け取り、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを含むリクエストを生成する工程；

該サービスリクエストが、該リクエストに回答して該サービスレジストリを検索し、該複数のサービスプロバイダの中に該リクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダが存在するか否かを決定する工程；

該複数のサービスプロバイダの中に該リクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダが存在すると決定された場合には、該サービスリクエストが、該リクエストを該サービスプロバイダに提供する工程；

該サービスプロバイダが、該リクエストに回答して該データベースを検索し、該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する工程；

該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在すると決定された場合には、該サービスプロバイダが、該刺激応答結果を該サービスリクエストに提供する工程；および

該サービスリクエストが、該刺激応答結果を表示する工程；

を包含する、方法。

#### 【請求項 136】

デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコン

コンピュータシステムであって、

少なくとも1つのデジタル細胞を格納したデータベースにアクセス可能なように構成されたサービスプロバイダであって、該少なくとも1つのデジタル細胞のそれぞれは、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合によって表現されており、該少なくとも1つの実験データのそれぞれは、該細胞を特定する細胞パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータと、該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果とを含む、サービスプロバイダ；および

ユーザが所望するサービスをリクエストするサービスリクエスト；

を備え、

該サービスリクエストは、

該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを受け取り、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを含むリクエストを生成する手段；および該リクエストを該サービスプロバイダに提供する手段；

を含み、

該サービスプロバイダは、

該リクエストに応答して該データベースを検索し、該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する手段；および

該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在すると決定された場合には、該刺激応答結果を該サービスリクエストに提供する手段；

を含み、

該サービスリクエストは、

該刺激応答結果を表示する手段；

をさらに含む、コンピュータシステム。

#### 【請求項 137】

前記サービスリクエストは、前記ユーザが操作するWebブラウザであり、前記サービスプロバイダは、インターネットを介して該サービスリクエストに接続されるWebサーバーである、請求項136に記載のコンピュータシステム。

#### 【請求項 138】

前記サービスリクエストは、XMLで記述した形式で前記リクエストを前記サービスプロバイダに提供する、請求項136に記載のコンピュータシステム。

#### 【請求項 139】

前記サービスプロバイダは、XMLで記述した形式で前記刺激応答結果を前記サービスリクエストに提供する、請求項136に記載のコンピュータシステム。

#### 【請求項 140】

デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコンピュータシステムであって、

複数のサービスプロバイダであって、該複数のサービスプロバイダのそれぞれは、少なくとも1つのデジタル細胞を格納したデータベースにアクセス可能なように構成されており、該少なくとも1つのデジタル細胞のそれぞれは、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合によって表現されており、該少なくとも1つの実験データのそれぞれは、該細胞を特定する細胞パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータと、該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果とを含む、複数のサービスプロバイ

ダ；

該複数のサービスプロバイダが提供可能な少なくとも1つのサービスを登録したサービスレジストリ；および

ユーザが所望するサービスをリクエストするサービスリクエスト；

を備え、

該サービスリクエストは、

該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを受け取り、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを含むリクエストを生成する手段；

該リクエストに応答して該サービスレジストリを検索し、該複数のサービスプロバイダの中に該リクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダが存在するか否かを決定する手段；および

該複数のサービスプロバイダの中に該リクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダが存在すると決定された場合には、該リクエストを該サービスプロバイダに提供する手段；

を含み、

該複数のサービスプロバイダのそれぞれは、

該リクエストに応答して該データベースを検索し、該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する手段；および

該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在すると決定された場合には、該刺激応答結果を該サービスリクエストに提供する手段；

を含み、

該サービスリクエストは、

該刺激応答結果を表示する手段；

をさらに含む、コンピュータシステム。

【請求項 141】

前記サービスリクエストは、インターネットを介して前記ユーザが操作するWebブラウザに接続されるWebサーバーであり、前記複数のサービスプロバイダのそれぞれは、該インターネットを介して該サービスリクエストに接続されるWebサーバーである、請求項140に記載のコンピュータシステム。

【請求項 142】

前記サービスリクエストは、XMLで記述した形式で前記リクエストを前記サービスプロバイダに提供する、請求項140に記載のコンピュータシステム。

【請求項 143】

前記サービスプロバイダは、XMLで記述した形式で前記刺激応答結果を前記サービスリクエストに提供する、請求項140に記載のコンピュータシステム。

【請求項 144】

細胞の情報に関するプロファイルデータを生成する方法であって、

a) 細胞を支持体上に固定して配置する工程；および

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；

を包含する、方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】デジタル細胞

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞の解析技術の分野にある。より詳細には、同一の環境にある細胞のプロファイルを提供する方法およびそのためのシステム、ならびにそのような技術によって得られたデータおよびデータ配列技術ならびにデジタル細胞技術に関する。以下に発明の詳細な説明を説明する。

【背景技術】

【0002】

生物の生存は、細胞外シグナルを認知し、そしてその細胞外シグナルに応答するそれらの能力に依存する。分子レベルにおいて、シグナルは、細胞のホメオスタシスを維持するように協同して作用し、そして増殖、分裂および分化のような活性を調節する相互作用タンパク質のネットワークを介して、認知され、そして伝達される。生物学的シグナル伝達ネットワークを通じた情報伝達は、主に、シグナルに応答して動的に集合および分解し得るタンパク質-タンパク質相互作用によって媒介され、外部事象を遺伝子発現における変化のような特定の結果に連結させる一過性の回路を作製する。これらのネットワークの基礎となるタンパク質-タンパク質相互作用をマップするために、多数の戦略が開発されている、そしてこれらの研究は、集合的に、*Saccharomyces cerevisiae* および他の生物について、ゲノム全体にわたるタンパク質-タンパク質相互作用の輪郭を描く豊富なデータを提供している。これらの手段は、非常に強力であるが、部分的に完成した像を提供するだけであって、おそらく、微妙な状況にある多くの相互作用（その相互作用は、それらの適切なシグナルが存在する場合にのみ、形成される）を見逃している。

【0003】

変異または低分子によるタンパク質-タンパク質相互作用の崩壊は、細胞表現型における大きな変化を誘発するシグナル伝達ネットワークの小さな混乱を可能にする生物学的な支柱を作製し得るが、所定のシグナル伝達経路における全てのタンパク質-タンパク質相互作用がこの力を保有するわけではないようである。従って、調節性タンパク質-タンパク質相互作用を同定することを目的とする補完的な戦略が、シグナル伝達研究および先導する開発の両方において、特別な役割を果たす。この点からして、タンパク質-タンパク質相互作用を規定し、そしてその相互作用に混乱を起こす相補的な手段とは、細胞中へタンパク質またはペプチドを人工的に導入し（これは、目的の内因性調節相互作用と競合し、そしてその関係を崩す（titrate-out））。それによって外部シグナルを細胞応答に連結させる正常な回路を破壊することである。機能的なアッセイ（例えば、シグナルに応答した遺伝子の活性化）とこの戦略を合わせることによって、機能的な妨害についてのスクリーニングは、調節性タンパク質-タンパク質相互作用を混乱させるペプチドを同定するために使用され得る。この戦略（しばしば、ドミナント妨害遺伝学またはドミナントネガティブ遺伝学と称される）は、いくつかのモデル生物において好首尾に使用され（ここで、高スループットのスクリーニング方法が、容易に適用されている、そして哺乳動物においてより少ない程度で使用されている（旧来、哺乳動物は、この型のスクリーニングの対象となりにくい）。ドミナントネガティブ戦略の1つの能力は、この戦略が機能的に関連するタンパク質-タンパク質相互作用の「支柱の点」の位置を正確に示し、それによって、外部の因子による機能的な調節を受けやすいタンパク質ネットワークの大きな網の中で、少ない数の中心点をあらわにすることである。従って、ドミナントネガティブ戦略の結果は、特定の経路を規定する調節成分に関する極めて重大な情報を提供し得、そして薬物スクリーニングプログラムによって標的化するのに適した重要なタンパク質-タンパク質相互作用を解明し得る。

【0004】

哺乳動物においてドミナントネガティブスクリーニングを開発する際の進行を妨げるも

のうちの1つは、トランスフェクト細胞またはトランスジェニック生物の作製である。この問題に取り組むための1つの手段として高効率のレトロウイルストランスフェクションが開発されている。このレトロウイルストランスフェクションは、強力であるが、ウイルス中間体にパッケージングされるDNAの作製を必要とし、全ての適用に適切な戦略ではない。相補的な手段として、高密度トランスフェクションアレイすなわち細胞アレイの使用が提唱されている。

#### 【0005】

Rosetta Inpharmaticsは、種々の特許出願において、細胞の情報をプロフィールとして提供することを提案している（特許文献1～11）。しかし、このようなプロフィールは、いずれも、環境の異なる別々の細胞からの情報を連続情報としてではなく、別個の情報の集合として処理しており、真の意味で、同一条件で、一個の（同じ）細胞に注目した情報解析を行っていないという点で限界がある。特に、このような技術では、ある変化の前後の特定の各一時点のみに注目して解析がなされており、ある一点（遺伝子）がとる時間的变化のプロセスを解析するものではない。

#### 【0006】

プロフィールまたはプロファイリングについては、近年の技術の進歩により、細胞の構成要素を正確に測定すること、それゆえにプロフィールを導出することが可能になってきている（例えば、非特許文献1～3；特許文献13）。ゲノム全体が知られている生物では、その細胞内の全遺伝子の転写産物を分析することが可能である。ゲノムの情報が増えつつあるヒトのような他の生物の場合には、細胞内の多数の遺伝子を同時にモニタリングすることが可能である。

#### 【0007】

アレイ技術の進展により、薬物探索の分野などでもアレイが使用されている（例えば、非特許文献4～5）。プロフィールを用いた解析（例えば、特許文献14を参照）およびプロフィールのクラスター化は、細胞の状態の詳細な解析、移植、薬物の分子標的ならびに薬物候補および／または薬物の関連機能、効力および毒性に関する情報を与える。このような比較は理想的な薬物活性または疾病状態を表す共通のプロフィールを誘導するためにも使用できる。さらに、プロフィールの比較は、患者の疾病を初期段階で検出するのに役立ち、病気があると診断された患者のための改善された臨床結果の予測を提供することができる。

#### 【0008】

しかし、真の意味で同一条件下で同じ細胞に関する情報を提供した例はいまだなく、上述の技術では、ヘテロな細胞集団の平均値としてデータが提示されることから、そのようなデータに基づく種々の解析および評価は、正確性に欠けるという欠点が存在する。従って、真の意味での細胞レベルでの状態を提示するための方法への需要が高まっている。

【特許文献1】特表2003-505038号

【特許文献2】特表2003-505022号

【特許文献3】特表2002-533701号

【特許文献4】特表2002-533700号

【特許文献5】特表2002-533699号

【特許文献6】特表2002-528095号

【特許文献7】特表2002-526757号

【特許文献8】特表2002-518021号

【特許文献9】特表2002-518003号

【特許文献10】特表2002-514804号

【特許文献11】特表2002-514773号

【特許文献12】特表2002-514437号

【特許文献13】米国特許第5,569,588号

【特許文献14】米国特許第5,777,888号

【非特許文献1】Schenら,1995, Quantitative monitoring of gene expression pa



terns with a complementaryDNA micro-array, Science 270:467-470

【非特許文献2】Lockhartら,1996, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, Nature Biotechnology 14:1675-1680

【非特許文献3】Blanchardら,1996, Sequence to array: Probing the genome's secrets, Nature Biotechnology 14:1649

【非特許文献4】Martonら,1998, Drug target validation and identification of secondary drug target effects using Microarrays, Nat Med. 1998 Nov;4(11):1293-301

【非特許文献5】Grayら,1998, Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors, Science 281:533-538

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0009】

本発明は、細胞の情報（プロファイル）・データを得る方法を提供することを課題とする。本発明はまた、同一の環境条件下で、細胞の状態に関する情報・データを得る方法、およびそのようなデータを正確に提示するための方法およびシステムを提供することを課題とする。特に、同一環境条件で細胞レベルでの情報を、複雑系という観点でそのままあるいは直接的に提示するシステムおよび方法ならびにそのようなデータおよびデータ配列技術そのものを提供することを課題とする。本発明はさらに、デジタル細胞およびその利用法を提供することを課題とする。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0010】

上記課題は、細胞を支持体上に固定して、細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成することによって解決された。これにより、細胞のプロファイルを連続的に収集することが可能になる。また、このデータ生成により、細胞の連続状態を再現することが可能となり、デジタル細胞を生成することが可能となった。

##### 【0011】

上記課題はまた、複数の細胞を同一環境下に配置することができる支持体を提供することによって解決された。そのような支持体は、例えば、塩またはアクチン作用物質、好ましくは塩およびアクチン作用物質の両方を使用して細胞を固定することによって達成された。これにより、同一環境下に配置された同一種の細胞のプロファイルを同時にかつ同一条件下で収集することが可能になった。これにより、

従って、本発明は、以下の発明を提供する。

##### 【0012】

(1) 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを生成する方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；および

b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；  
を包含する、方法。

##### 【0013】

(2) 上記生物学的因子は、核酸分子または上記核酸分子に由来する分子である、項目1に記載の方法。

##### 【0014】

(3) 上記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および  
b) 塩、を含む、組成物によって、上記支持体に固定される、項目1に記載の方法。

##### 【0015】

(4) 上記細胞には、アクチン作用物質が提供される、項目1に記載の方法。

##### 【0016】



(5) 上記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および b) 塩、を含む、組成物によって、上記支持体に固定され、かつ、アクチン作用物質が提供される、項目 1 に記載の方法。

【0017】

(6) 上記生物学的因子は、核酸分子、タンパク質、糖鎖、脂質、低分子、それらの複合分子からなる群より選択される、項目 1 に記載の方法。

【0018】

(7) 上記細胞は、モニター前に少なくとも約 3 日間培養される、項目 1 に記載の方法。

【0019】

(8) 上記生物学的因子は、遺伝子をコードする核酸分子を含む、項目 1 に記載の方法。

【0020】

(9) 上記プロファイルは、遺伝子発現のプロファイルを含む、項目 1 に記載の方法。

【0021】

(10) 上記プロファイルは、アポトーシスシグナルのプロファイルを含む、項目 1 に記載の方法。

【0022】

(11) 上記プロファイルは、ストレスシグナルのプロファイルである、項目 1 に記載の方法。

【0023】

(12) 上記プロファイルは、分子の局在化に関するプロファイルである、項目 1 に記載の方法。

【0024】

(13) 上記分子は、蛍光、燐光、放射性物質またはその組み合わせにて標識される、項目 12 に記載の方法。

【0025】

(14) 上記プロファイルは、細胞形態の変化を含む、項目 1 に記載の方法。

【0026】

(15) 上記プロファイルは、プロモーターのプロファイルを含む、項目 1 に記載の方法。

【0027】

(16) 上記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含む、項目 1 に記載の方法。

【0028】

(17) 上記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含み、上記特定薬剤を投与するさらに工程を含む、項目 1 に記載の方法。

【0029】

(18) 外来因子が上記細胞に提供される工程をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

【0030】

(19) 上記外来因子は、RNA i を含む、項目 18 に記載の方法。

【0031】

(20) 上記外来因子は、生体に存在しない化学物質を含む、項目 18 に記載の方法。

【0032】

(21) 上記プロファイルは、分子間相互作用のプロファイルを含む、項目 1 に記載の方法。

【0033】

(22) 上記外来因子は、上記細胞のレセプターに対するリガンドを含む、項目18に記載の方法。

【0034】

(23) 上記プロファイルは、レセプターリガンド相互作用のプロファイルを含む、項目1に記載の方法。

【0035】

(24) 上記プロファイルは細胞形態であり、上記方法は、遺伝子の過剰発現、過小発現もしくはノックダウン、外来因子の添加および環境の変化からなる群より選択される、刺激を上記細胞に与える工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0036】

(25) 上記プロファイルは、上記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含む、項目1に記載の方法。

【0037】

(26) 上記方法は、ツーハイブリッド法、FRETおよびBRETからなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0038】

(27) 上記プロファイルは、上記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含み、上記方法は、ツーハイブリッド法、FRETおよびBRETからなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0039】

(28) 上記細胞は、上記支持体上にアレイ状に配置される、項目1に記載の方法。

【0040】

(29) 上記細胞は、上記支持体上にアレイ状に配置され、上記複数の細胞は、各々が最大1mmの間隔をあけて配置される、項目1に記載の方法。

【0041】

(30) 上記プロファイルはリアルタイムに得られる、項目1に記載の方法。

【0042】

(31) 上記細胞を固相支持体に固定する工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0043】

(32) 上記データは、上記プロファイルに関する情報を含む、項目1に記載の方法。

【0044】

(33) 上記データは、上記モニターにおける条件に関する情報を含む、項目1に記載の方法。

【0045】

(34) 上記データは、上記細胞の状態に関する情報を含む、項目1に記載の方法。

【0046】

(35) 上記モニターされる生物学的因子は、少なくとも2種の生物学的因子を含む、項目1に記載の方法。

【0047】

(36) 上記モニターされる生物学的因子は、少なくとも3種の生物学的因子を含む、項目1に記載の方法。

【0048】

(37) 上記モニターされる生物学的因子は、少なくとも8種の生物学的因子を含む、項目1に記載の方法。

【0049】

(38) 生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0050】

(39) 上記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、項目1に記載の方法。

【0051】

(40) 上記支持体は、固相支持体を含む、項目1に記載の方法。

【0052】

(41) 上記支持体は、基板を含む、項目1に記載の方法。

【0053】

(42) 上記生物学的因子は核酸分子であり、上記細胞は、上記核酸分子でトランスフェクトされる、項目1に記載の方法。

【0054】

(43) 上記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、項目42に記載の方法。

【0055】

(44) 上記トランスフェクトは固相上で行われる、項目42に記載の方法。

【0056】

(45) 上記プロファイルの位相を比較する工程を包含する、項目1に記載の方法。

【0057】

(46) 上記細胞のプロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、項目1に記載の方法。

【0058】

(47) 上記プロファイルは、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理により処理される工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0059】

(48) 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを提示方法であって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および
  - c) 上記データを提示する工程、
- を包含する、方法。

【0060】

(49) 上記提示はリアルタイムである、項目48に記載の提示方法。

【0061】

(50) 上記提示は、視覚で感知されるように行われる、項目48に記載の方法。

【0062】

(51) 上記提示は、聴覚で感知されるように行われる、項目48に記載の方法。

【0063】

- (52) 同一環境にある細胞の状態を判定する方法であって、
- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および
  - c) 上記データから上記細胞の状態を判定する工程、
- を包含する、方法。

【0064】

(53) 上記プロファイルと上記細胞の状態とを予め関連付ける工程をさらに包含する、項目52に記載の方法。

【0065】

(54) 上記細胞は、状態が既知の細胞を含む、項目52に記載の方法。

【0066】

(55) 上記生物学的因子は、少なくとも2種存在する、項目52に記載の方法。

## 【0067】

(56) 上記生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、項目52に記載の方法。

## 【0068】

(57) 上記データは、リアルタイムで生成される、項目52に記載の方法。

## 【0069】

(58) 上記状態は、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期および増殖状態からなる群より選択される、項目52に記載の方法。

## 【0070】

(59) 上記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、項目52に記載の方法。

## 【0071】

(60) 上記固相支持体は、基板を含む、項目52に記載の方法。

## 【0072】

(61) 上記生物学的因子は核酸分子であり、上記細胞は上記核酸分子でトランスフェクトされる、項目52に記載の方法。

## 【0073】

(62) 上記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、項目61に記載の方法。

## 【0074】

(63) 上記生物学的因子は、他の生物学的因子に結合する能力を有する、項目52に記載の方法。

## 【0075】

(64) 上記判定工程c)は、上記プロファイルの位相を比較することを包含する、項目52に記載の方法。

## 【0076】

(65) 上記判定工程c)は、上記プロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、項目52に記載の方法。

## 【0077】

(66) 上記判定工程c)は、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理を包含する、項目52に記載の方法。

## 【0078】

(67) 外来因子と、上記外来因子に対する細胞の応答とを相関付ける方法であって、

a) 細胞を、複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上で、外来因子に曝露する工程；

b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および

c) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける工程；  
を包含する、方法。

## 【0079】

(68) 上記細胞は、上記支持体に固定される、項目67に記載の方法。

## 【0080】

(69) 少なくとも2つの上記外来因子を使用して、各外来因子に対するプロファイルを得る工程をさらに包含する、項目67に記載の方法。

## 【0081】

(70) 少なくとも2つの上記プロファイルを類別することにより、上記プロファイルに対応する外来因子を類別する工程をさらに包含する、項目67に記載の方法。

## 【0082】

(71) 上記プロファイルは、リアルタイムで提示される、項目70に記載の方法。

## 【0083】

(72) 上記細胞は、アレイ上で培養される、項目67に記載の方法。

## 【0084】

(73) 上記工程(b)におけるプロファイルのモニターは、上記アレイから画像データをを得ることを包含する、項目67に記載の方法。

## 【0085】

(74) 上記(c)における上記外来因子と上記プロファイルとを相関付ける工程は、上記プロファイルの位相の異同を識別する工程である、項目67に記載の方法。

## 【0086】

(75) 上記外来因子は、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧からなる群から選択される、項目67に記載の方法。

## 【0087】

(76) 上記化学物質は、生体分子、化学合成物または培地である、項目75に記載の方法。

## 【0088】

(77) 上記生体分子は、核酸分子、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リポタンパク質、糖タンパク質およびプロテオグリカンからなる群から選択される、項目76に記載の方法。

## 【0089】

(78) 上記生体分子は、ホルモン、サイトカイン、細胞接着因子および細胞外マトリクスからなる群より選択される少なくとも1つの生体分子を含む、項目76に記載の方法。

## 【0090】

(79) 上記化学物質は、レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストである、項目75に記載の方法。

## 【0091】

(80) 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法であって、

a) 細胞に、同一環境を保つことができる支持体上で、複数の既知の外来因子を曝露する工程；

b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターし、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得て上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；

c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける工程；

d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；

e) 外来因子に曝露された上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る工程；

f) 上記工程(b)で得られたプロファイルの中から、上記工程(e)で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；および

g) 上記未同定の外来因子は、上記工程(f)において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する工程；  
を包含する、方法。

## 【0092】

(81) 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法であって、

a) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する工程；

- b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；
  - c) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る工程；
  - d) 上記工程 (a) において提供された、上記プロファイルの中から、上記工程 (c) において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；および
  - e) 上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する工程；
- を包含する、方法。

**【0093】**

(82) 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを得る方法であって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；および
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る工程、
- を包含する、方法。

**【0094】**

(83) 項目 1 に記載の方法によつて生成されたデータが格納される記録媒体。

**【0095】**

(84) 上記記録媒体は、上記モニターにおける条件に関する情報、上記プロファイルに関する情報、上記細胞の状態に関する情報および上記生物学的因子に関する情報からなる群より選択される、少なくとも 1 つの情報に関するデータをさらに含む、項目 83 に記載の記録媒体。

**【0096】**

(85) 上記データは、互いにリンクされた形態で格納される、項目 84 に記載の記録媒体。

**【0097】**

(86) 上記データは、上記細胞ごとにリンクされて格納される、項目 84 に記載の記録媒体。

**【0098】**

(87) 項目 1 に記載された方法によって生成されたデータ。

**【0099】**

(88) 項目 1 に記載された方法によって生成されたデータを含む伝送媒体。

**【0100】**

(89) 同一環境にある複数の細胞の情報に関するプロファイルデータを生成するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；および
  - c) 上記モニター手段から得られた信号から上記細胞のプロファイルのデータを生成する手段；
- を備える、システム。

**【0101】**

(90) 複数の細胞をさらに含む、上記複数の細胞は上記支持体に固定される、項目 89 に記載のシステム。

**【0102】**

(91) 上記支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの物質が付着される、項目 90 に記載のシステム。

**【0103】**

(92) 上記モニター手段は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的また

は生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干渉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラからなる群より選択される少なくともひとつの手段を含む、項目 89 に記載のシステム。

【0104】

(93) 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを提示するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - c) 上記モニター手段から得られた信号から上記細胞のプロファイルのデータを生成する手段；および
  - d) 上記データを提示する手段、
- を備える、システム。

【0105】

(94) 複数の細胞をさらに含み、上記複数の細胞は上記支持体に固定される、項目 93 に記載のシステム。

【0106】

(95) 上記支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの物質が付着される、項目 93 に記載のシステム。

【0107】

(96) 上記モニター手段は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干渉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラからなる群より選択される少なくともひとつの手段を含む、項目 93 に記載のシステム。

【0108】

(97) 上記データを提示する手段は、ディスプレイである、項目 93 に記載のシステム。

【0109】

(98) 上記データを提示する手段は、スピーカである、項目 93 に記載のシステム。

【0110】

(99) 細胞の状態を判定するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
- b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
- c) 上記モニター手段から得られた信号からデータを生成する手段；および
- d) 上記データから上記細胞の状態を外挿する手段、

を備える、システム。

【0111】

(100) 外来因子と、上記外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 外来因子を曝露する手段；
  - c) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - d) 上記モニター手段からの信号から、上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および
  - e) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける手段；
- を備える、システム。

**【0112】**

(101) 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
- b) 既知の外来因子を曝露する手段；
- c) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
- d) 外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得て上記細胞のプロファイルのデータを生成する手段；
- e) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける手段；
- f) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；
- g) 上記手段(d)で得られた既知の外来因子のプロファイルと、未知の外来因子のプロファイルとを比較し、既知の外来因子のプロファイルの中から、未知の外来因子のプロファイルに対応するプロファイルを決断する手段であって、上記決定された未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子である、手段、を備える、システム。

**【0113】**

(102) 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムであって、

- a) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータが格納された記録媒体；
- b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；
- c) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
- d) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
- e) 上記モニター手段から得られた信号から、上記細胞のプロファイルを得る手段；
- f) 上記記録媒体(a)において格納される上記プロファイルの中から、未知の外来因子に関して得られたプロファイルに対応するプロファイルを決断する手段であって、上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子である、手段、を備える、システム。

**【0114】**

(103) 複数の細胞を固定し得、かつ、上記細胞の環境を同一に維持し得る支持体。

**【0115】**

(104) 上記支持体上の細胞は、アレイ状に配置され得る、項目103に記載の支持体。

**【0116】**

(105) 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体、またはアクチン作用物質を含む、項目103に記載の支持体。

**【0117】**

(106) 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体、ならびにアクチン作用物質を含む、項目103に記載の支持体。

**【0118】**

(107) 上記細胞は、最大1mm以下の間隔で配置され得る、項目103に記載の支持体。

**【0119】**

(108) 固定された細胞をさらに含む、項目103に記載の支持体。

**【0120】**



(109) 固定された生物学的因子をさらに含む、項目104に記載の支持体。

【0121】

(110) 上記生物学的因子は2種類以上固定される、項目109に記載の支持体。

【0122】

(111) 細胞および生物学的因子が固定される、項目103に記載の支持体。

【0123】

(112) 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともに固定される、項目103に記載の支持体。

【0124】

(113) 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともにアレイ状に固定される、項目103に記載の支持体。

【0125】

(114) 塩と、遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、核酸分子と、細胞とがアレイ状に固定される、項目104に記載の支持体。

【0126】

(115) 上記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される塩を含む、項目114に記載の支持体。

【0127】

(116) 上記遺伝子導入試薬は、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウム、オリゴフェクタミンおよびオリゴフェクターからなる群より選択される少なくともひとつの試薬を含む、項目114に記載の支持体。

【0128】

(117) 上記アクチン作用物質は、フィブロネクチン、ラミニンおよびビトロネクチンからなる群より選択される少なくとも1つのタンパク質またはその改変体もしくはフラグメントを含む、項目114に記載の支持体。

【0129】

(118) 上記核酸分子は、サイトカイン、ホルモン、細胞接着因子、細胞骨格タンパク質および酵素からなる群より選択されるタンパク質をコードする配列を含む、項目114に記載の支持体。

【0130】

(119) 上記細胞は、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、細菌細胞および真菌細胞からなる群より選択される細胞を含む、項目114に記載の支持体。

【0131】

(120) 上記支持体の材料は、ガラス、シリカ、およびプラスチックからなる群より選択される材料を含む、項目114に記載の支持体。

【0132】

(121) 固定された複数の細胞を含み、かつ、上記細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する方法であって、

A) 支持体を提供する工程；および

B) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて上記支持体上に固定する工程、を含む、方法。

【0133】

(122) 上記固定工程は、上記塩と、上記正に荷電した物質としての遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、上記負に荷電した物質としての核酸分子と、上記細胞との混合物を、アレイ状に固定することを含む、項目121に記載の方法。

【0134】

(123) 上記固定工程は、プリント工程を含む、項目121に記載の方法。

【0135】

(124) 上記支持体の提供は、支持体材料から上記支持体を作製する工程を包含する、項目121に記載の方法、。

【0136】

(125) 固定された複数の細胞を含み、かつ、上記細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する装置であって、

A) 支持体を提供する手段；および

B) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて上記支持体上に固定する手段  
を備える、装置。

【0137】

(126) 上記固定手段は、プリント手段を含む、項目125に記載の装置。

【0138】

(127) 上記支持体提供手段は、支持体材料から上記支持体を成型する手段を含む、項目125に記載の装置。

【0139】

本発明の他の実施形態、好ましい形態は、添付の図面を参酌しながら、本明細書の好ましい実施形態を理解することによって達成され得ることが認識され得る。

(128) デジタル細胞を生産する方法であって、

a) 実験対象の細胞を特定する細胞パラメータを取得する工程；

b) 該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータを取得する工程；

c) 該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータを取得する工程；

d) 該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果を取得する工程；

e) 該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータと該刺激応答結果とを関連づけることにより、該細胞に対する1つの実験データを生成する工程；および

f) 工程a)～工程e)を必要に応じて繰り返すことにより、該細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合を生成し、該少なくとも1つの実験データの集合をデジタル細胞として提供する工程；

を包含する、方法。

(129) 前記環境パラメータは、前記細胞を培養する培地を示すパラメータと、前記培地の条件を示すパラメータとを含む、請求項128に記載の方法。

(130) 前記刺激パラメータは、レポーターを示すパラメータと、化学刺激を示すパラメータとを含む、請求項128に記載の方法。

(131) 前記刺激応答結果は、前記細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターすることによって得られる該細胞のプロファイルのデータを含む、請求項128に記載の方法。

(132) 前記方法は、前記デジタル細胞をデータベースに格納する工程をさらに包含する、請求項128に記載の方法。

(133) デジタル細胞を生産する装置であって、

a) 実験対象の細胞を特定する細胞パラメータを取得する手段；

b) 該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータを取得する手段；

c) 該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータを取得する手段；

d) 該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果を取得する手段；

e) 該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータと該刺激応答結果とを関連づけることにより、該細胞に対する 1 つの実験データを生成する手段；および

f) 工程 a) ~ 工程 e) を必要に応じて繰り返すことにより、該細胞に対する少なくとも 1 つの実験データの集合を生成し、該少なくとも 1 つの実験データの集合をデジタル細胞として提供する手段；

を備えた、装置。

(134) サービスリクエストとサービスプロバイダとを含むコンピュータシステムを用いて、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供する方法であって、

少なくとも 1 つのデジタル細胞を格納したデータベースを用意する工程であって、該少なくとも 1 つのデジタル細胞のそれぞれは、実験対象の細胞に対する少なくとも 1 つの実験データの集合によって表現されており、該少なくとも 1 つの実験データのそれぞれは、該細胞を特定する細胞パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータと、該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果とを含む、工程；

該サービスリクエストが、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを受け取り、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを含むリクエストを生成する工程；

該サービスリクエストが、該リクエストを該サービスプロバイダに提供する工程；

該サービスプロバイダが、該リクエストに回答して該データベースを検索し、該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する工程；

該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在すると決定された場合には、該サービスプロバイダが、該刺激応答結果を該サービスリクエストに提供する工程；および

該サービスリクエストが、該刺激応答結果を表示する工程；

を包含する、方法。

(135) サービスリクエストと複数のサービスプロバイダとを含むコンピュータシステムを用いて、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供する方法であって、

少なくとも 1 つのデジタル細胞をそれぞれ格納した複数のデータベースを用意する工程であって、該少なくとも 1 つのデジタル細胞のそれぞれは、実験対象の細胞に対する少なくとも 1 つの実験データの集合によって表現されており、該少なくとも 1 つの実験データのそれぞれは、該細胞を特定する細胞パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータと、該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果とを含む、工程；

該複数のサービスプロバイダが提供可能な少なくとも 1 つのサービスを登録したサービスレジストリを用意する工程；

該サービスリクエストが、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを受け取り、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを含むリクエストを生成する工程；

該サービスリクエストが、該リクエストに回答して該サービスレジストリを検索し、該複数のサービスプロバイダの中に該リクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイ

ダが存在するか否かを決定する工程；

該複数のサービスプロバイダの中に該リクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダが存在すると決定された場合には、該サービスリクエストが、該リクエストを該サービスプロバイダに提供する工程；

該サービスプロバイダが、該リクエストに回答して該データベースを検索し、該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する工程；

該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在すると決定された場合には、該サービスプロバイダが、該刺激応答結果を該サービスリクエストに提供する工程；および

該サービスリクエストが、該刺激応答結果を表示する工程；

を包含する、方法。

(136) デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコンピュータシステムであって、

少なくとも1つのデジタル細胞を格納したデータベースにアクセス可能なように構成されたサービスプロバイダであって、該少なくとも1つのデジタル細胞のそれぞれは、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合によって表現されており、該少なくとも1つの実験データのそれぞれは、該細胞を特定する細胞パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータと、該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果とを含む、サービスプロバイダ；および

ユーザが所望するサービスをリクエストするサービスリクエスト；

を備え、

該サービスリクエストは、

該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを受け取り、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを含むリクエストを生成する手段；および該リクエストを該サービスプロバイダに提供する手段；

を含み、

該サービスプロバイダは、

該リクエストに回答して該データベースを検索し、該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する手段；および

該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在すると決定された場合には、該刺激応答結果を該サービスリクエストに提供する手段；

を含み、

該サービスリクエストは、

該刺激応答結果を表示する手段；

をさらに含む、コンピュータシステム。

(137) 前記サービスリクエストは、前記ユーザが操作するWebブラウザであり、前記サービスプロバイダは、インターネットを介して該サービスリクエストに接続されるWebサーバーである、請求項136に記載のコンピュータシステム。

(138) 前記サービスリクエストは、XMLで記述した形式で前記リクエストを前記サービスプロバイダに提供する、請求項136に記載のコンピュータシステム。

(139) 前記サービスプロバイダは、XMLで記述した形式で前記刺激応答結果を前記サービスリクエストに提供する、請求項136に記載のコンピュータシステム。

(140) デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコンピュータシステムであって、

複数のサービスプロバイダであって、該複数のサービスプロバイダのそれぞれは、少なくとも1つのデジタル細胞を格納したデータベースにアクセス可能なように構成されており、該少なくとも1つのデジタル細胞のそれぞれは、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合によって表現されており、該少なくとも1つの実験データのそれぞれは、該細胞を特定する細胞パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞を培養する環境を特定する環境パラメータと、該細胞パラメータによって特定された該細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータと、該環境パラメータによって特定された該環境下で該細胞パラメータによって特定された該細胞が該刺激パラメータによって特定された該刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果とを含む、複数のサービスプロバイダ；

該複数のサービスプロバイダが提供可能な少なくとも1つのサービスを登録したサービスレジストリ；および

ユーザが所望するサービスをリクエストするサービスリクエスト；  
を備え、

該サービスリクエストは、

該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを受け取り、該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとを含むリクエストを生成する手段；

該リクエストに応答して該サービスレジストリを検索し、該複数のサービスプロバイダの中に該リクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダが存在するか否かを決定する手段；および

該複数のサービスプロバイダの中に該リクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダが存在すると決定された場合には、該リクエストを該サービスプロバイダに提供する手段；

を含み、

該複数のサービスプロバイダのそれぞれは、

該リクエストに応答して該データベースを検索し、該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する手段；および

該データベース内に該リクエストに含まれる該細胞パラメータと該環境パラメータと該刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在すると決定された場合には、該刺激応答結果を該サービスリクエストに提供する手段；

を含み、

該サービスリクエストは、

該刺激応答結果を表示する手段；

をさらに含む、コンピュータシステム。

(141) 前記サービスリクエストは、インターネットを介して前記ユーザが操作するWebブラウザに接続されるWebサーバーであり、前記複数のサービスプロバイダのそれぞれは、該インターネットを介して該サービスリクエストに接続されるWebサーバーである、請求項140に記載のコンピュータシステム。

(142) 前記サービスリクエストは、XMLで記述した形式で前記リクエストを前記サービスプロバイダに提供する、請求項140に記載のコンピュータシステム。

(143) 前記サービスプロバイダは、XMLで記述した形式で前記刺激応答結果を前記サービスリクエストに提供する、請求項140に記載のコンピュータシステム。

(144) 細胞の情報に関するプロファイルデータを生成する方法であって、

a) 細胞を支持体上に固定して配置する工程；および

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；

を包含する、方法。

(145) 前記生物学的因子は、核酸分子または該核酸分子に由来する分子である、請求項144に記載の方法。

- (1 4 6) 前記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および  
b) 塩、を含む、組成物によって、前記支持体に固定される、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 4 7) 前記細胞には、アクチン作用物質が提供される、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 4 8) 前記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および  
b) 塩、を含む、組成物によって、前記支持体に固定され、かつ、アクチン作用物質が提供される、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 4 9) 前記生物学的因子は、核酸分子、タンパク質、糖鎖、脂質、低分子、それらの複合分子からなる群より選択される、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 0) 前記細胞は、モニター前に少なくとも約 3 日間培養される、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 1) 前記生物学的因子は、遺伝子をコードする核酸分子を含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 2) 前記プロファイルは、遺伝子発現のプロファイルを含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 3) 前記プロファイルは、アポトーシスシグナルのプロファイルを含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 4) 前記プロファイルは、ストレスシグナルのプロファイルである、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 5) 前記プロファイルは、分子の局在化に関するプロファイルである、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 6) 前記分子は、蛍光、燐光、放射性物質またはその組み合わせにて標識される、請求項 1 3 9 に記載の方法。
- (1 5 7) 前記プロファイルは、細胞形態の変化を含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 8) 前記プロファイルは、プロモーターのプロファイルを含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 5 9) 前記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 6 0) 前記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含み、前記特定薬剤を投与するさらに工程を含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 6 1) 外来因子が前記細胞に提供される工程をさらに包含する、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 6 2) 前記外来因子は、RNA i を含む、請求項 1 6 1 に記載の方法。
- (1 6 3) 前記外来因子は、生体に存在しない化学物質を含む、請求項 1 6 1 に記載の方法。
- (1 6 4) 前記プロファイルは、分子間相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 6 5) 前記外来因子は、前記細胞のレセプターに対するリガンドを含む、請求項 1 6 1 に記載の方法。
- (1 6 6) 前記プロファイルは、レセプターリガンド相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 6 7) 前記プロファイルは細胞形態であり、前記方法は、遺伝子の過剰発現、過小発現もしくはノックダウン、外来因子の添加および環境の変化からなる群より選択される、刺激を該細胞に与える工程をさらに包含する、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 6 8) 前記プロファイルは、前記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 6 9) 前記方法は、ツーハイブリッド法、FRET および BRET からなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、請求項 1 4 4 に記載の方法。
- (1 7 0) 前記プロファイルは、前記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイ

ルを含み、前記方法は、ツーハイブリッド法、FRETおよびBRETからなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、請求項144に記載の方法。

(171) 前記細胞は、前記支持体上にアレイ状に配置される、請求項144に記載の方法。

(172) 前記細胞は、前記支持体上にアレイ状に配置され、前記複数の細胞は、各々が最大1mmの間隔をあけて配置される、請求項144に記載の方法。

(173) 前記プロファイルはリアルタイムに得られる、請求項144に記載の方法。

(174) 前記細胞を固相支持体に固定する工程をさらに包含する、請求項144に記載の方法。

(175) 前記データは、前記プロファイルに関する情報を含む、請求項144に記載の方法。

(176) 前記データは、前記モニターにおける条件に関する情報を含む、請求項144に記載の方法。

(177) 前記データは、前記細胞の状態に関する情報を含む、請求項144に記載の方法。

(178) 前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも2種の生物学的因子を含む、請求項144に記載の方法。

(179) 前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも3種の生物学的因子を含む、請求項144に記載の方法。

(180) 前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも8種の生物学的因子を含む、請求項144に記載の方法。

(181) 生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、請求項144に記載の方法。

(182) 前記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、請求項144に記載の方法。

(183) 前記支持体は、固相支持体を含む、請求項144に記載の方法。

(184) 前記支持体は、基板を含む、請求項144に記載の方法。

(185) 前記生物学的因子は核酸分子であり、前記細胞は、該核酸分子でトランスフェクトされる、請求項144に記載の方法。

(186) 前記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、請求項185に記載の方法。

(187) 前記トランスフェクトは固相上で行われる、請求項185に記載の方法。

(188) 前記プロファイルの位相を比較する工程を包含する、請求項144に記載の方法。

(189) 前記細胞のプロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、請求項144に記載の方法。

(190) 前記プロファイルは、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理により処理される工程をさらに包含する、請求項144に記載の方法。

#### 【0140】

以下に、本発明の好ましい実施形態を示すが、当業者は本発明の説明および当該分野における周知慣用技術からその実施形態などを適宜実施することができ、本発明が奏する作用および効果を容易に理解することが認識されるべきである。

#### 【発明の効果】

#### 【0141】

本発明のよって、細胞の状態に関する連続情報（プロファイル）・データが得られる。同一の環境条件における細胞の状態に関する情報・データ（特に連続情報・連続プロファイル）が再現性よく得られる。本発明によって、そのようなデータを正確に提示するための方法およびシステムが提供される。特に、同一環境条件で細胞レベルでの情報を、複雑系という観点でそのままあるいは直接的に提示するシステムおよび方法ならびにそのようなデータおよびデータ配列技術そのものが提供されたことは驚くべき効果である。本発明



はさらに、従来不可能であった、実際の生のデータの基づくデジタル細胞およびその利用法を提供するという効果を奏する。

【0142】

このように、本発明により、驚くべきほど少ない因子を観察することによって、細胞の状態を判定し、試験し、研究することが可能になった。このような判定により、診断、予防、治療に応用することが可能となり、その応用範囲は医療のみならず、食品、化粧品、農業、環境など種々の分野に及ぶ。また、コンピュータ上で生実験を再現できることから、バイオテクノロジーにおける教育および研究を行うことができるようになったという効果も奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0143】

以下、本発明の実施の形態を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞または形容詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

【0144】

（用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0145】

（細胞生物学）

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞）であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。

【0146】

本明細書において使用される「デジタル細胞」とは、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合をいう。これらの実験データは、現実の細胞に対して行った実験の実験条件と実験結果とを関連づけたものである。デジタル細胞は、実験条件が与えられ、その実験条件に関連する実験結果を再現可能なように構成されている。本明細書において想定されるデジタル細胞は、実験可能な細胞すべてを包含する。従って、本明細書において説明されるすべての細胞に関する記載は、適用可能である限り、デジタル細胞にも適用されることが理解されるべきである。

【0147】

デジタル細胞を用いると、現実の細胞に対して行った実験の実験結果をコンピュータシステム上で再現することができる。これにより、実験設備を持たない研究機関、教育機関および個人においても、細胞に関する教育および最先端の研究を行うことが可能になる。その結果、従来はこの分野に参入することが不可能であった異業種からもこの分野に参入することが可能になる。

【0148】

本発明で用いられる細胞は、どの生物由来の細胞（たとえば、任意の種類の単細胞生物（例えば、細菌、酵母）または多細胞生物（例えば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎



動物)、植物(たとえば、単子葉植物、双子葉植物など)など)でもよい。例えば、脊椎動物(たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など)由来の細胞が用いられ、より詳細には、哺乳動物(例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など)由来の細胞が用いられる。1つの実施形態では、霊長類(たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト)由来の細胞、特にヒト由来の細胞が用いられるがそれに限定されない。本発明において用いられる細胞は、上記細胞は、幹細胞であってもよく体細胞であってもよい。また、そのような細胞は、付着細胞、浮遊細胞、組織形成細胞およびそれらの混合物などであり得る。そのような細胞は、移植目的に使用されるものであってもよい。

#### 【0149】

本発明において、臓器が対象とされる場合、そのような臓器はどのような臓器でもよく、また本発明が対象とする組織または細胞は、生物のどの臓器または器官に由来するものでもよい。本明細書において「臓器」または「器官」とは、互換可能に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物(例えば、動物、植物)では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象とする臓器は、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本発明の多能性細胞から分化した細胞としては、表皮細胞、脾実質細胞、脾管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0150】

本明細書において「組織」(tissue)とは、多細胞生物において、実質的に同一の機能および/または形態をもつ細胞集団をいう。通常「組織」は、同じ起源を有するが、異なる起源を持つ細胞集団であっても、同一の機能および/または形態を有するのであれば、組織と呼ばれ得る。従って、本発明の幹細胞を用いて組織を再生する場合、2以上の異なる起源を有する細胞集団が一つの組織を構成し得る。通常、組織は、臓器の一部を構成する。動物の組織は、形態的、機能的または発生的根拠に基づき、上皮組織、結合組織、筋肉組織、神経組織などに区別される。植物では、構成細胞の発達段階によって分裂組織と永久組織とに大別され、また構成細胞の種類によって単一組織と複合組織とに分けるなど、いろいろな分類が行われている。

#### 【0151】

本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能(すなわち多能性)(「pluripotency」)を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹(ES)細胞または組織幹細胞(組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう)であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞(たとえば、本明細書において記載される融合細胞、再プログラム化された細胞など)もまた、幹細胞であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が限定されている細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核/細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本明細書において使用される場合は、幹細胞は胚性幹細胞であっても、組織幹細胞であってもよい。

## 【0152】

由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、膵（共通）幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

## 【0153】

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。

## 【0154】

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、膵幹細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような胚葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、リンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞が使用され得る。

## 【0155】

本明細書において「単離された」とは、通常的环境において天然に付随する物質が少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないをいう。従って、単離された細胞とは、天然の環境において付随する他の物質（たとえば、他の細胞、タンパク質、核酸分子など）を実質的に含まない細胞をいう。核酸分子またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸分子またはポリペプチドを指す。単離された核酸分子は、好ましくは、その核酸分子が由来する生物において天然に該核酸分子に隣接している（flanking）配列（即ち、該核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。

## 【0156】

本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質（例えば、多分化能）を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を維持する。

## 【0157】

本明細書において「分化（した）細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞（例えば、筋細胞、神経細胞など）をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、膵実質細胞、膵管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。

## 【0158】

本明細書において細胞の「状態」とは、細胞の種々のパラメータ（例えば、細胞周期、外来因子に対する応答、シグナル伝達、遺伝子発現、遺伝子の転写など）に関する状況をさす。そのような状態としては、例えば、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期、増殖状態などが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0159】

本明細書において、「分化」または「細胞分化」とは、1個の細胞の分裂によって由来した娘細胞集団の中で形態的および／または機能的に質的な差をもった二つ以上のタイプの細胞が生じてくる現象をいう。従って、元来特別な特徴を検出できない細胞に由来する細胞集団（細胞系譜）が、特定のタンパク質の産生などはっきりした特徴を示すに至る過程も分化に包含される。現在では細胞分化を、ゲノム中の特定の遺伝子群が発現した状態

と考えることが一般的であり、このような遺伝子発現状態をもたらす細胞内あるいは細胞外の因子または条件を探索することにより細胞分化を同定することができる。細胞分化の結果は原則として安定であって、特に動物細胞では、別のタイプの細胞に分化することは例外的にしか起こらない。従って、本発明の S t m 遺伝子は、未分化細胞のマーカーとして非常に有用であり得る。

#### 【0160】

本明細書において「多能性」または「多分化能」とは、互換可能に用いられ、細胞の性質をいい、1以上、好ましくは2以上の種々の組織または臓器に分化し得る能力をいう。従って、「多能性」および「多分化能」は、本明細書においては特に言及しない限り「未分化」と互換可能に用いられる。通常、細胞の多能性は発生が進むにつれて制限され、成体では一つの組織または器官の構成細胞が別のものの細胞に変化することは少ない。従って多能性は通常失われている。とくに上皮性の細胞は他の上皮性細胞に変化しにくい。これが起きる場合通常病的な状態であり、化生 (metaplasia) と呼ばれる。しかし間葉系細胞では比較的単純な刺激で他の間葉性細胞にかわり化生を起こしやすいので多能性の程度は高い。胚性幹細胞は、多能性を有する。組織幹細胞は、多能性を有する。本明細書において、多能性のうち、受精卵のように生体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力は全能性といい、多能性は全能性の概念を包含し得る。ある細胞が多能性を有するかどうかは、たとえば、体外培養系における、胚様体 (Embryoid Body) の形成、分化誘導条件下での培養等が挙げられるがそれらに限定されない。また、生体を用いた多能性の有無についてのアッセイ法としては、免疫不全マウスへの移植による奇形種 (テラトーマ) の形成、胚盤胞への注入によるキメラ胚の形成、生体組織への移植、腹水への注入による増殖等が挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、多能性のうち、受精卵のように生体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力は「全能性」といい、多能性は全能性の概念を包含し得る。また、1つの方向にのみ分化する能力は、単能性ともいう。

#### 【0161】

(生化学・分子生物学)

本明細書において「因子」 (agent) としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素 (例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー) でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸 (例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む)、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子 (例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子 (例えば、低分子リガンドなど) など)、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を (例えば、70%以上の配列同一性) もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物 (例えば、単鎖抗体)、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0162】

本明細書において「生物学的因子」とは、生命体 (例えば、細胞) に関連する因子をいう。好ましくは、通常の状態では細胞に存在する因子を生物学的因子という。そのような生物学的因子としては、例えば、核酸分子、タンパク質、糖、脂肪、代謝物、低分子、それらの複合体など、ならびに時間的要素が入った因子などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、生物学的因子としては、電流、電位 (例えば、膜電位など)、pH、浸透圧なども本発明に包含されることが理解される。本明細書において有用な生物学的因子

としては、例えば、転写制御配列（例えば、プロモーターなど）、構造遺伝子またはそれをコードする核酸分子挙げられる。「生物学的因子」の「集合体」とは、本明細書において使用される場合、複数の生物学的因子（同種または異種）をいう。好ましくは、協働している生物学的因子をさす。

#### 【0163】

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子（たとえば、プロモーター）という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。近年では、ゲノムが解析され、配列自体はすべて判明している。その機能は必ずしも判明しているわけではないが、タンパク質もRNAもコードしない配列も存在する。そのような配列もまた、遺伝形質に影響を有していることが充分理解され、したがって、そのような配列もまた、本明細書の最も広義な定義においては遺伝子の概念に入ることが理解される。したがって、例えば、サイクリン遺伝子というときは、通常、サイクリンの構造遺伝子およびサイクリンのプロモーターの両方を包含する。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。

#### 【0164】

本明細書において配列（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、配列（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて同一性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、同一性と類似性とは同じ数値を示す。

#### 【0165】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

#### 【0166】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプチド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。フィプロネクチ

ンのような細胞外マトリクスタンパク質の遺伝子産物は、通常ポリペプチド形態をとる。

【0167】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチルリボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体 (例えば、縮重コドン置換体) および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された (または、すべての) コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzeraら、Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。フィブロネクチンのような細胞外マトリクスタンパク質などの遺伝子は、通常、このポリヌクレオチド形態をとる。また、トランスフェクションの対象となる分子もこのポリヌクレオチドである。

【0168】

本明細書において、「対応する」アミノ酸または核酸とは、それぞれあるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、あるいは有することが予測されるアミノ酸または核酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、あるポリヌクレオチドの転写制御配列であれば、その転写制御配列の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

【0169】

本明細書において、「対応する」遺伝子 (例えば、ポリペプチドまたは核酸分子) とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログあるいは種相同体であり得る。したがって、マウスサイクリン遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子 (例えば、マウスサイクリン遺伝子) の配列をクエリ配列として用いてその動物 (例えばヒ



ト、ラット)の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

#### 【0170】

本明細書において、「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド(長さが $n$ )に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個(または例えば上下10%)のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。

#### 【0171】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子(例えば、ポリペプチドまたは核酸分子など)が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能(例えば、転写促進活性)を発揮する活性が包含される。例えば、ある因子がアンチセンス分子である場合、その生物学的活性は、対象となる核酸分子への結合、それによる発現抑制などを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。その生物学的活性が転写調節活性である場合は、転写レベルまたはその変動を調節する活性をいう。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

#### 【0172】

本明細書において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC(saline-sodium citrate)溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムである)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。

「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有

するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

#### 【0173】

本明細書において「塩」は、当該分野において通常用いられる最も広い意味と同じ意味で用いられ、無機塩および有機塩の両方を含む。塩は、通常、酸と塩基との中和反応によって生成する。塩には中和反応で生成する $\text{NaCl}$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ などといったもののほかに、金属と酸との反応で生成する $\text{PbSO}_4$ 、 $\text{ZnCl}_2$ など種々の種類があり、これらは、直接中和反応によって生成したものでもなく、酸と塩基との中和反応から生成したとみなすことができる。塩としては、正塩（酸のHや塩基のOHが塩に含まれていないもの、例えば、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{CH}_3\text{COONa}$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ）、酸性塩（酸のHが塩に残っているもの、例えば、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{KHSO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$ ）、塩基性塩（塩基のOHが塩の中に残っているもの、例えば、 $\text{MgCl}(\text{OH})$ 、 $\text{CuCl}(\text{OH})$ ）などに分類することができるがそれらの分類は、本発明においてはそれほど重要ではない。好ましい塩としては、培地を構成する塩（例えば、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸、ビタミン、緩衝液を構成する塩（例えば、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム）などが好ましい。細胞に対する親和性を保持または改善する効果がより高いからである。これらの塩は、単独で用いてもよいし、複数用いてもよい。複数用いることが好ましい。細胞に対する親和性が高くなる傾向があるからである。従って、 $\text{NaCl}$ などを単独で用いるよりも、培地中に含まれる塩（例えば、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム）を複数を用いることが好ましく、より好ましくは、培地中に含まれる塩全部をそのまま使用することが有利であり得る。別の好ましい実施形態では、グルコースを加えてもよい。

#### 【0174】

本明細書において使用される用語「物質」は、当該分野において用いられる最も広義な意味と同じ意味で含まれ、正または負に荷電することができるものを含む。

#### 【0175】

本明細書において「正に荷電した物質」は、正荷電を有するすべての物質を包含する。そのような物質としては、例えば、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質などのカチオン性物質が含まれるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような正に荷電した物質は、複合体を形成することができる物質であることが有利である。そのような複合体を形成することができる正に荷電した物質としては、例えば、カチオン性ポリマーのようにある程度の分子量を有する物質、あるいは、カチオン性脂質のように特定の溶媒（例えば、水、水溶液など）中においてある程度溶解せずに残存することができる物質などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい正に荷電した物質としては、例えば、ポリエチレンジイミン、ポリLリシン、合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、正に荷電した物質としては、ヒストン、合成ポリペプチドなどのような生体分子が挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい正に荷電した物質の種類は、複合体を形成するパートナーである負に荷電した物質の種類に応じて変動する。好ましい複合体形成パートナーを選択することは、当業者には容易であり、そのような選択は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。そのような好ましい複合体形成パートナーの選択においては、種々のパラメータを考慮することができる。そのようなパラメータとしては、例えば、電荷、分子量、疎水性、親水性、置換基の性質、pH、温度、塩濃度、圧力などの種々の物理的パラメータ、化学的パラメータなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0176】

本明細書において「カチオン性ポリマー」は、カチオン性の官能基を有するポリマーをいい、例えば、ポリエチレンジイミン、ポリLリシン、合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0177】

本明細書において「カチオン性脂質」は、カチオン性の官能基を有する脂質をいい、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、及びその誘導体が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0178】

ここで、カチオン性の官能基としては、例えば、一級アミン、二級アミン、三級アミンが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0179】

本明細書において「負に荷電した物質」は、負荷電を有するすべての物質を包含する。そのような物質としては、例えば、DNAなどの生体分子ポリマー、アニオン性脂質などのアニオン性物質が含まれるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような負に荷電した物質は、複合体を形成することができる物質であることが有利である。そのような複合体を形成することができる負に荷電した物質としては、例えば、DNAのようなアニオン性ポリマーのようにある程度の分子量を有する物質、あるいは、アニオン性脂質のように特定の溶媒（例えば、水、水溶液など）中においてある程度溶解せずに残存することができる物質などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい負に荷電した物質としては、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化合物、及びその複合体などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、負に荷電した物質としては、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化合物、及びその複合体などのような生物学的因子または生体分子が挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい負に荷電した物質の種類は、複合体を形成するパートナーである正に荷電した物質の種類に応じて変動する。好ましい複合体形成パートナーを選択することは、当業者には容易であり、そのような選択は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。そのような好ましい複合体形成パートナーの選択においては、種々のパラメータを考慮することができる。そのようなパラメータもまた、上述の正に荷電した物質において考慮すべきパラメータと同様、種々のものを包含する。

## 【0180】

本明細書において「アニオン性ポリマー」は、アニオン性の官能基を有するポリマーをいい、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化合物、及びその複合体が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0181】

本明細書において「アニオン性脂質」は、アニオン性の官能基を有する脂質をいい、例えば、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0182】

ここで、アニオン性の官能基としては、例えば、カルボキシル基、リン酸基が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0183】

また、目的の物質に対して、正電荷または負電荷を有する置換基などの部分を付加することによって、その目的の物質の電荷を変換することも可能である。好ましい複合体パートナーが固定を目的とする物質と同じ電荷を有している場合に、いずれかの電荷を変換することによって複合体形成を促進することが可能である。

## 【0184】

本明細書において「複合体」とは、二つ以上の物質が互いに直接的または間接的に相互作用する結果、それらの物質の総体があたかも1つの物質のように挙動するものをいう。

## 【0185】

本明細書において「複合体パートナー」とは、複合体を形成するあるメンバーについて言及するとき、そのメンバーと直接的または間接的に相互作用する別のメンバーをいう。

## 【0186】

本明細書において複合体を形成する条件は、複合体パートナーの種類に応じて変動する。そのような条件は、当業者は容易に理解することができ、当該分野において周知の技法



を用いて任意の複合体パートナー（例えば、正に荷電した物質および負に荷電した物質）から複合体を形成させることができる。

#### 【0187】

本明細書において、正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体が使用されるとき、そのいずれかまたは両方は、生物学的因子と同一であってもよい。

#### 【0188】

本明細書において「固定」とは、固相支持体について用いられるとき、その対象となる物質（例えば、生体分子）がその支持体において少なくともある一定の時間の間保持される状態またはそのような状態にさせることをいう。従って、物質が固相支持体上で固定された後、条件が変化する（例えば、別の溶媒中に浸される）場合は、その固定状態が解除されてもよい。

#### 【0189】

本明細書において用いられる「細胞親和性」とは、ある物質が細胞（例えば、細菌細胞、動物細胞、酵母、植物細胞など）または細胞を含む物体（例えば、組織、臓器、生体など）と相互作用が可能な状態に置かれたときに、その細胞または細胞を含む物体に対して有害な影響を与えない性質をいう。好ましくは、細胞親和性を有する物質は、細胞が優先的に相互作用する物質であり得るがそれに限定されない。本発明では、固定されるべき物質（例えば、正に荷電した物質および／または負に荷電した物質）は、細胞親和性を有することが好ましいがそれに限定されない。固定されるべき物質が細胞親和性を有する場合、その物質が本発明にしたがって固定されると、細胞親和性が保持または改善されることが予想外に見いだされた。通常、細胞親和性を有する物質が固相支持体に固定される場合は、必ずしも細胞親和性が保持されるとは限らなかったことに鑑みると、本発明の効果は計り知れない。

#### 【0190】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

#### 【0191】

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。

#### 【0192】

本明細書において、「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))、FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448 (1988))、Smith and Waterman 法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197 (1981))、および Needleman and Wunsch 法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1

970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ(マイクロアレイアッセイ)、PCRおよび *in situ* ハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0193】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子(例えば、DNAまたはRNAなど)が用いられ得る。

#### 【0194】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、16の連続するヌクレオチド長の、17の連続するヌクレオチド長の、18の連続するヌクレオチド長の、19の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成(増幅)が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム(例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTar)を用いて行ってもよい。

#### 【0195】

本明細書において、「エピトープ」とは、構造の明らかな抗原決定基をいう。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、T細胞の場合は、T細胞レセプタータンパク質および/もしくは主要組織適合性複合体(MHC)レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが含まれる。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、分子の特徴(例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷)であり、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に3つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも6つ、7つ、8つ、9つ、または10のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学、および2次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geysenら(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998(所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的な方法); 米国特許第4,708,871号(抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順); およびGeysenら(1986) *Molecular Immunology* 23:709(所定の抗体に対して高い親

和性を有するペプチドを同定するための技術)を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

#### 【0196】

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも3アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4アミノ酸、より好ましくは5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。

#### 【0197】

本明細書においてある核酸分子またはポリペプチドに「特異的に結合する因子」とは、その核酸分子またはポリペプチドに対するその因子の結合レベルが、その核酸分子またはポリペプチド以外の核酸分子またはポリペプチドに対するその因子の結合レベルと同じかまたはそれよりも高い因子をいう。そのような因子としては、例えば、対象が核酸分子の場合、対象となる核酸分子に対して相補的な配列を有する核酸分子、対象となる核酸配列に対して結合するポリペプチド(例えば、転写因子など)などが挙げられ、対象がポリペプチドの場合、抗体、単鎖抗体、レセプターリガンドの対のいずれか一方、酵素-基質のいずれか一方などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0198】

本明細書において用いられる用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF(ab')<sub>2</sub>およびFab断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、αガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式によって限定されない。この用語は、全免疫グロブリン分子ならびにFab分子、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fvフラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

#### 【0199】

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術(例えば、KohlerおよびMilstein, Nature (1975) 256:495)またはその改変(例えば、Buckら(1982) In Vitro 18:377)を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓(および必要に応じていくつかの大きなリンパ節)を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的な免疫グロブリンを発現するB細胞がプレートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られたB細胞(すなわちすべての剥離した脾臓細胞)をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させる。

#### 【0200】

本明細書において「抗原」(antigen)とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(immunogen)とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。

#### 【0201】

あるタンパク質分子において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明

らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

#### 【0202】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている (Kyte, J および Doolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157 (1): 105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子 (例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など) との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは: イソロイシン (+4.5); バリン (+4.2); ロイシン (+3.8); フェニルアラニン (+2.8); システイン/シスチン (+2.5); メチオニン (+1.9); アラニン (+1.8); グリシン (-0.4); スレオニン (-0.7); セリン (-0.8); トリプトファン (-0.9); チロシン (-1.3); プロリン (-1.6); ヒスチジン (-3.2); グルタミン酸 (-3.5); グルタミン (-3.5); アスパラギン酸 (-3.5); アスパラギン (-3.5); リジン (-3.9); およびアルギニン (-4.5) である。

#### 【0203】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質 (例えば、酵素活性において等価なタンパク質) を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。

#### 【0204】

親水性指数もまた、保存的置換において考慮され得る。米国特許第 4,554,101 号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている: アルギニン (+3.0); リジン (+3.0); アスパラギン酸 (+3.0±1); グルタミン酸 (+3.0±1); セリン (+0.3); アスパラギン (+0.2); グルタミン (+0.2); グリシン (0); スレオニン (-0.4); プロリン (-0.5±1); アラニン (-0.5); ヒスチジン (-0.5); システイン (-1.0); メチオニン (-1.3); バリン (-1.5); ロイシン (-1.8); イソロイシン (-1.8); チロシン (-2.3); フェニルアラニン (-2.5); およびトリプトファン (-3.4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

#### 【0205】

(プロファイルおよび関連技術)

本明細書において、細胞に関する「プロファイル」とは、細胞の生物学的状態の測定の集合をいう。特に、細胞のプロファイルという場合は、プロファイルとは、「細胞構成要素」のレベルを定量的に測定したものの測定値の集合あるいは連続であり得る。細胞構成要素には、生物学的系における遺伝子発現レベル、転写レベル (転写制御配列の活性レベル)、特定の遺伝子をコードする mRNA の存在量、およびタンパク質発現レベルが含まれる。遺伝子をコードする mRNA および/またはタンパク質発現レベルなどの細胞の各

種構成要素のレベルは、薬物による処置や他の細胞生物学的状態の刺激 (perturbation) または振動に応答して変化することが知られている。したがって、複数のそのような「細胞構成要素」の測定は、細胞の生物学的状態に対する刺激の効果に関する情報を豊富に含むことから、このプロファイルは、細胞の分析および詳細な解析においてますます重要となっている。哺乳動物細胞においては3万以上の異なる細胞構成要素が存在する。個々の細胞のプロファイルは通常複雑である。生物学的系の所定の状態のプロファイルは、しばしば、その生物学的系が刺激に付された後で測定される。そのような刺激としては、生物学的系と関係した実験的または環境的状态があり、例えば、生物学的系の薬物候補への暴露、外因性遺伝子の導入、時間の経過、系からの遺伝子の欠失、または培養条件の変更などがある。細胞構成要素の広範囲にわたる測定、つまり細胞における遺伝子の複製または転写、およびタンパク質の発現ならびにそれらの刺激に対する応答のプロファイルは、細胞自体の調査に加えて、薬物の効果の比較および検討、疾病の診断、患者の投薬法の最適化を含めて、広範な有用性がある。さらに、それらは基本的なライフサイエンスの研究においても有用である。このようなプロファイルは、種々の形態でデータとして生成され、提示される。そのような形態としては、数字と時間との関数の形態、グラフ形態、画像形態などが挙げられるがそれらに限定されない。したがって、プロファイルに関するデータは、ときに、「プロファイルデータ」と本明細書において称することがある。このようなデータ生成は、コンピュータにより容易に達成され得る。適切なプログラムのコード化もまた当該分野において周知の技術で実施され得る。

#### 【0206】

本発明の細胞分析では、細胞またはそれに相互作用する物質に起因する情報を検出することができる限り、種々の検出方法および検出手段を用いることができる。そのような検出方法および検出手段としては、例えば、目視、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる方法および手段を挙げることができるがそれらに限定されない。

#### 【0207】

本明細書において特に「経時プロファイル」というとき、ある特定の細胞に関して言及するとき、その細胞に関するあるパラメータの経時変化を示すプロファイルをいう。そのような経時プロファイルとしては、例えば、転写状態の経時プロファイル、発現状態 (翻訳状態) の経時プロファイル、シグナル伝達の経時プロファイル、神経電位の経時プロファイルなどがあるがそれらに限定されない。経時プロファイルを生成するためには、あるパラメータ (例えば、転写状態に関連する標識に起因する信号) を連続して記録し、プロファイル生成する必要がある。経時的に測定することは、連続的に測定することであるから、本明細書において「経時プロファイル」は、ときに、連続プロファイルとも称され得る。

#### 【0208】

本明細書において細胞の「情報」とは、細胞中に存在する多くの要素を結合して全体として目的を指向させる働きをしているものをいう。情報の集合体がデジタル細胞を構成するといえる。

#### 【0209】

本明細書において細胞、生物などの「状態」とは、細胞の種々のパラメータ (例えば、細胞周期、外来因子に対する応答、シグナル伝達、遺伝子発現、遺伝子の転写など) に関する状況をさす。そのような状態としては、例えば、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期、増殖状態などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、特に、対象となる生物の環境、例えば、温度、湿度 (例えば、絶対湿度、相対湿度など)、pH、塩濃度 (例えば、塩全体の濃度または特定の塩の濃度)、栄養 (例えば、炭水化物量など)、金属 (例えば、金属全体の量または特定の金属 (例えば、重金属) の濃度など)、ガス (例えば、ガス全体の量または特定のガスの量)、有機溶媒 (例えば、有機溶媒全体の量または特定の有機溶媒 (例えば、エタノールなど) の量)、圧力 (例

えば、局所圧または全体の圧など）、気圧、粘性、流速（例えば、培地中に生物が存在する場合のその培地の流速など）、光度（ある特定波長の光量など）、光波長（例えば、可視光のほか紫外線、赤外線なども含み得る）、電磁波、放射線、重力、張力、音波、対象となる生物とは異なる他の生物（例えば、寄生虫、病原菌など）、化学薬品（例えば、医薬品など）、抗生物質、天然物、精神的ストレス、物理的ストレスなどのようなパラメータに対する反応性または耐性を、そのような状態に関する指標として使用することができる。

#### 【0210】

本明細書においてある主体にとって「環境」（environment、Umgebung）とは、その主体に対するその外囲をいう。環境は、種々の構成要素、状態量が認められ、これらは環境要因といわれる、上記のようなパラメータが例示される。環境要因は、通常、非生物的環境要因と生物的環境要因とに大別され得る。非生物的環境要因（無機的環境）を物理的と化学的とに、あるいは気候的と土壌的とに区別することもある。こうした種々の環境要因の生物に対する作用は、各々が独立的に行われるとは限らず、互いに関連しあっている場合が多い。したがって、本明細書では、環境は、それぞれの要因ごとに観察してもよいし、環境要因の総体（種々のパラメータの総体）として認識されてもよい。このような環境を同一に保つことは従来困難であると考えられてきた。これは特に、細胞の維持が困難であること、細胞をうまく固定することができず、しかも、導入を目的とする遺伝子などの物質が細胞内に導入されることが困難であることに起因する。本発明は、少なくともこれらの1つを解決した。なお、本明細書において「同一の環境」とは、細胞にとって実質的に同一の環境であることを意味する。したがって、細胞が同様に増殖、分化などをすることができる限り、そのような環境は同一の環境であるといえる。本明細書では、同一の環境とは、特定の刺激（例えば、外部刺激）を除き、他のパラメータが同一であることを意味する。

#### 【0211】

そのような環境を考慮する要因としては、例えば、温度、湿度、pH、塩濃度、栄養、金属、ガス、有機溶媒、圧力、気圧、粘性、流速、光度、光波長、電磁波、放射線、重力、張力、音波、対象となる生物とは異なる他の生物（例えば、寄生虫）、化学薬品、抗生物質、天然物、化学的ストレスおよび物理的ストレスからなる群より選択される少なくとも1つの因子をパラメータとして包含する。

#### 【0212】

ここで、温度としては、例えば、高温、低温、超高温（例えば、95℃など）、超低温（例えば、-80℃など）、150～-270℃のような広汎な温度が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0213】

湿度としては、例えば、相対湿度100%、相対湿度0%など0～100%の間の任意の点が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0214】

pHとしては、例えば、0～14の任意の点が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0215】

塩濃度としては、例えば、NaCl濃度（3%など）、他の塩の塩濃度0～100%のうちの任意の点が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0216】

栄養としては、例えば、タンパク質、グルコース、脂質、ビタミン、無機塩等が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0217】

金属としては、例えば、重金属（例えば、水銀、カドミウムなど）、鉛、金、ウラン、銀が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0218】

ガスとしては、例えば、酸素、窒素、二酸化炭素、一酸化炭素、一酸化窒素、およびそ



これらの混合物などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0219】

有機溶媒としては、例えば、エタノール、メタノール、キシレン、プロパノールなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0220】

圧力としては、例えば、0～10トン/cm<sup>2</sup>の任意の点などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0221】

気圧としては、例えば、0～100気圧の任意の点などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0222】

粘性としては、例えば、水、グリセロールなど任意の流体またはそれらの混合物中の粘性が挙げられるがそれらに限定されない。

【0223】

流速としては、例えば、0～光速の任意の点などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0224】

光度としては、例えば、暗黒～太陽光の間の一点などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0225】

光波長としては、例えば、可視光線、紫外線（UV-A、UV-B、UV-Cなど）、赤外線（遠赤外線、近赤外線など）などの任意の波長が挙げられるがそれらに限定されない。

【0226】

電磁波としては、任意の波長のものが挙げられる。

【0227】

放射線としては、任意の強度のものが挙げられる。

【0228】

重力としては、地球上の任意の重力または無重力～地球上の重力の間の1点、あるいは地球上の重力以上の任意の一点が挙げられるがそれらに限定されない。

【0229】

張力としては、任意の強度のものが挙げられる。

【0230】

音波としては、任意の強度および波長のものが挙げられる

対象となる生物とは異なる他の生物としては、例えば、寄生虫、病原菌、昆虫、線虫が挙げられるがそれらに限定されない。

【0231】

化学薬品としては、例えば、塩酸、硫酸、苛性ソーダが挙げられるがそれらに限定されない。

【0232】

抗生物質としては、例えば、ペニシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、キノロン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0233】

天然物としては、例えば、ふぐ毒、蛇毒、アルカロイド等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0234】

物理的ストレスとしては、例えば、振動、騒音、電気、衝撃が挙げられるがそれらに限定されない。

【0235】

本明細書において本発明のデジタル細胞が使用されるとき、環境は「環境パラメータ」

として提示される。環境パラメータは、培地（種類、組成）、pH、温度、湿度、CO<sub>2</sub>濃度、O<sub>2</sub>濃度、抗生物質の存否、ある特定栄養素の存否などを含むがそれらに限定されない。

#### 【0236】

本明細書において「刺激」とは、外部から細胞に対して与えられる特異的な生活活動の発現または増強を喚起・誘発するような作用因子をいう。刺激としては、物理的刺激、化学的刺激、生物学的刺激、生化学的刺激などが挙げられるがそれらに限定されない。物理刺激としては、例えば、光、電波、電流、圧力、音（振動）などが挙げられるがそれらに限定されない。化学的刺激としては、例えば、化学物質による刺激が挙げられ、例えば、抗生物質、栄養素、ビタミン、金属、イオン、酸、アルカリ、塩、緩衝剤などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的刺激としては、例えば、他の生物の存在（例えば、寄生生物の存在、細胞集団の密度など）が挙げられるがそれらに限定されない。生化学的刺激としては、細胞シグナル伝達因子の存在などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0237】

本明細書において本発明のデジタル細胞が使用されるとき、刺激は「刺激パラメータ」として提示される。刺激パラメータとしては、上述の任意の刺激に対応するパラメータが利用され得る。本明細書では、刺激パラメータには、刺激を伝達するための因子（例えば、レポーター）が含まれることが理解されるべきである。そのようなレポーターとしては、例えば、抗生物質に対するオンオフ、転写制御配列、放射能、蛍光物質などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0238】

本明細書において刺激に対する「応答」は、細胞がある刺激に対して有するすべての応答（例えば、細胞の形状の変化、代謝変化、他の挙動の変化、シグナル伝達の変化など）を意味する。従って、例えば本発明におけるデジタル細胞実験の結果は、細胞動態データとして記録され得る。あるいは、上述のレポーターが利用されるときは、そのような刺激応答結果は、そのレポーターの生データであり得るか、あるいはそのレポーターのデータを変換したデータであり得る。

#### 【0239】

本明細書において「転写制御配列」とは、遺伝子の転写レベルを調節することができる配列をいう。そのような配列は、少なくとも2ヌクレオチド長を有する。そのような配列としては、代表的に、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、ターミネーター、他のゲノム構造中構造遺伝子のランキング配列およびエキソン以外のゲノム配列、ならびにエキソン中の配列などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明において用いられる転写制御配列は、特定の種類に関するものではない。むしろ、転写制御配列として重要な情報は、その経時的な変動である。このような変動は、（細胞状態の変化）プロセスともいう。従って、本発明では、このような転写制御配列は、任意に選択することができる。そのような転写制御配列の中には、従来はマーカーとして使用されていなかったものを含んでいてもよい。好ましくは、転写制御配列は、転写因子に結合する能力を有する。

#### 【0240】

本明細書において「転写因子」とは、遺伝子の転写の過程を調節する因子をいう。転写因子は、主として転写開始反応を調節する因子をさす。RNAポリメラーゼをDNA上のプロモーター領域に配置するために必要な基本転写因子群、および転写領域の上流や下流に存在するシス作用要素に結合してRNAの合成開始頻度を調節する各種の転写調節因子に大別される。

#### 【0241】

基本転写因子群はRNAポリメラーゼの種類に応じて用意されているが、TATA結合タンパク質は全転写系に共通であるとされている。転写因子の種類は多岐にわたるが、通常、構造上DNA結合に必要な部分と転写活性化または抑制に必要な部分とからなることが多い。DNA結合部位をもちシス作用要素に結合することができる因子を総称してトランス作用因子ともいう。



## 【0242】

転写活性化または抑制に必要な部分は、他の転写因子や基本転写因子群との相互作用に関与しており、DNAや転写開始複合体の構造変化を通して転写調節を果たしていると考えられている。これら各部の構造上の特性から転写調節因子はいくつかのグループあるいはファミリーに分類され、発生または細胞分化において重要な役割をもつ因子も多い。

## 【0243】

そのような転写因子としては、例えば、STAT1、STAT2、STAT3、GAS、NFAT、My c、AP1、CREB、NF $\kappa$ B、E2F、Rb、p53、RUNX1、RUNX2、RUNX3、Nkx-2、CF2-11、Skn-1、SRY、HFH-2、Oct-1、Oct-3 Sox-5、HNF-3b、PPAR $\gamma$ などが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0244】

本明細書において「ターミネーター」とは、通常遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に関与する配列をいう。ターミネーターは、mRNAの安定性に関与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

## 【0245】

本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、通常RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。したがって、本明細書においてある遺伝子のプロモーターの働きを有する部分を「プロモーター部分」という。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2kbp以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモーター領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。好ましくは、推定プロモーター領域は、第一エキソン翻訳開始点から上流約2kbp以内に存在する。プロモーターとしては、例えば、構成的プロモーター、特異的プロモーターおよび誘導性プロモーターなどが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0246】

本明細書において「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられる配列をいう。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

## 【0247】

本明細書において「サイレンサー」とは、遺伝子発現を抑制し静止する機能を有する配列をいう。本発明では、サイレンサーとしてはその機能を有する限り、どのようなものを用いてもよく、サイレンサーを用いなくともよい。

## 【0248】

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

## 【0249】

本明細書では、他のゲノム構造中構造遺伝子のフランキング配列およびエキソン以外のゲノム配列、ならびにエキソン中の配列もまた重要であり得る。例えば、上述の特定の名称が付された配列以外の構造遺伝子のフランキング配列もまた、「プロセス」という観点では、転写制御に関連することが充分予想される。従って、そのようなフランキング配列もまた、本明細書では、転写制御配列に含まれる。エキソン以外のゲノム配列およびエキソン中の配列もまた、「プロセス」という観点では、転写制御に関連することが充分予想される。従って、エキソン以外のゲノム配列およびエキソン中の配列もまた、本明細書で

は、転写制御配列に含まれる。

#### 【0250】

本明細書において「RNAi」とは、RNA interferenceの略称で、二本鎖RNA (dsRNAともいう) のようなRNAiを引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同なmRNAが特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書においてRNAiはまた、場合によっては、RNAiを引き起こす因子と同義に用いられ得る。

#### 【0251】

本明細書において「RNAiを引き起こす因子」とは、RNAiを引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「RNAiを引き起こす因子」とは、その遺伝子に関するRNAiを引き起こし、RNAiがもたらす効果（例えば、その遺伝子の発現抑制など）が達成されることをいう。そのようなRNAiを引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約70%の相同性を有する配列またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも10ヌクレオチド長の二本鎖部分を含むRNAまたはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3' 突出末端を含み、より好ましくは、3' 突出末端は、2ヌクレオチド長以上のDNA（例えば、2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

#### 【0252】

理論に束縛されないが、RNAiが働く機構として考えられるものの一つとして、dsRNAのようなRNAiを引き起こす分子が細胞に導入されると、比較的長い（例えば、40塩基対以上）RNAの場合、ヘリカーゼドメインを持つダイサー（Dicer）と呼ばれるRNase III様のヌクレアーゼがATP存在下で、その分子を3' 末端から約20塩基対ずつ切り出し、短鎖dsRNA（siRNAとも呼ばれる）を生じる。本明細書において「siRNA」とは、short interfering RNAの略称であり、人工的に化学合成されるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5' -リン酸、3' -OHの構造を有しており、3' 末端は約2塩基突出している。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、RISC (RNA-induced silencing complex) が形成される。この複合体は、siRNAと同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNase III様の酵素活性によってsiRNAの中央部でmRNAを切断する。siRNAの配列と標的として切断するmRNAの配列の関係については、100%一致することが好ましい。しかし、siRNAの中央から外れた位置についての塩基の変異については、完全にRNAiによる切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存する。他方、siRNAの中央部の塩基の変異は影響が大きく、RNAiによるmRNAの切断活性が極度に低下する。このような性質を利用して、変異をもつmRNAについては、その変異を中央に配したsiRNAを合成し、細胞内に導入することで特異的に変異を含むmRNAだけを分解することができる。従って、本発明では、siRNAそのものをRNAiを引き起こす因子として用いることができるし、siRNAを生成するような因子（例えば、代表的に約40塩基以上のdsRNA）をそのような因子として用いることができる。

#### 【0253】

また、理論に束縛されることを希望しないが、siRNAは、上記経路とは別に、siRNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRP）のプライマーとして作用し、dsRNAが合成され、このdsRNAが再びダイサーの基質となり、新たなsiRNAを生じて作用を増幅することも企図される。従って、本発明では、siRNA自体およびsiRNAが生じるような因子もまた、有用である。実際に、昆虫などでは、例えば35分子のdsRNA分子が、1,000コピー以上ある細胞内のmRNAをほぼ完全に分解することから、siRNA自体およびsiRNAが生じ

るような因子が有用であることが理解される。

【0254】

本発明において s i RNA と呼ばれる、約 20 塩基前後（例えば、代表的には約 21 ～ 23 塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖 RNA を用いることができる。このような s i RNA は、細胞に発現させることにより遺伝子発現を抑制し、その s i RNA の標的となる病原遺伝子の発現を抑えることから、疾患の治療、予防、予後などに使用することができる。

【0255】

本発明において用いられる s i RNA は、RNA i を引き起こすことができる限り、どのような形態を採っていてもよい。

【0256】

別の実施形態において、本発明の RNA i を引き起こす因子は、3' 末端に突出部を有する短いヘアピン構造（shRNA; short hairpin RNA）であり得る。本明細書において「shRNA」とは、一本鎖 RNA で部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約 20 塩基対以上の分子をいう。そのような shRNA は、人工的に化学合成される。あるいは、そのような shRNA は、センス鎖およびアンチセンス鎖の DNA 配列を逆向きに連結したヘアピン構造の DNA を T7 RNA ポリメラーゼによりインビトロで RNA を合成することによって生成することができる。理論に束縛されることは希望しないが、そのような shRNA は、細胞内に導入された後、細胞内で約 20 塩基（代表的には例えば、21 塩基、22 塩基、23 塩基）の長さに分解され、s i RNA と同様に RNA i を引き起こし、本発明の処置効果があることが理解されるべきである。このような効果は、昆虫、植物、動物（哺乳動物を含む）など広汎な生物において発揮されることが理解されるべきである。このように、shRNA は、s i RNA と同様に RNA i を引き起こすことから、本発明の有効成分として用いることができる。shRNA はまた、好ましくは、3' 突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約 10 ヌクレオチド長以上、より好ましくは約 20 ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3' 突出末端は、好ましくは DNA であり得、より好ましくは少なくとも 2 ヌクレオチド長以上の DNA であり得、さらに好ましくは 2 ～ 4 ヌクレオチド長の DNA であり得る。

【0257】

本発明において用いられる RNA i を引き起こす因子は、人工的に合成した（例えば、化学的または生化学的）ものでも、天然に存在するものでも用いることができ、この両者の間で本発明の効果に本質的な違いは生じない。化学的に合成したものでは、液体クロマトグラフィーなどにより精製をすることが好ましい。

【0258】

本発明において用いられる RNA i を引き起こす因子は、インビトロで合成することもできる。この合成系において、T7 RNA ポリメラーゼおよび T7 プロモーターを用いて、鋳型 DNA からアンチセンスおよびセンスの RNA を合成する。これらをインビトロでアニーリングした後、細胞に導入すると、上述のような機構を通じて RNA i が引き起こされ、本発明の効果が達成される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法でそのような RNA を細胞内に導入することができる。

【0259】

本発明の RNA i を引き起こす因子としてはまた、mRNA とハイブリダイズし得る一本鎖、あるいはそれらのすべての類似の核酸アナログのような因子も挙げられる。そのような因子もまた、本発明の処置方法および組成物において有用である。

【0260】

本明細書において「経時的」とは、時間の経過に対して何らかの行為または現象を関連付けることをいう。

【0261】

本明細書において「モニター」または「ディスプレイ」とは、少なくとも 1 つのパラメ

ータ（例えば、転写に起因する標識信号など）を指標に、細胞の状態を観測することをいう。好ましくは、モニターは、検出機器または計測機器などの機器装置を用いて行われる。より好ましくは、このような機器は、データを記録および／または処理するためにコンピュータに接続される。モニターは、固相支持体（例えば、アレイ、プレートなど）の画像データを得る工程を含み得る。

#### 【0262】

本明細書において「リアルタイム」とは、ある状態が、実質的に同時に別の形態で表示される（例えば、ディスプレイ上の画像としてあるいはデータ処理されたグラフとして）ことをいう。そのような場合、リアルタイムは、データ処理にかかる時間だけタイムラグが生じるが、このようなタイムラグは、実質的に無視できる場合は、リアルタイムに含まれる。そのようなタイムラグは、通常10秒以内であり、好ましくは1秒以内であり得るが、それらに限定されず、用途によっては、10秒を超える場合もまたリアルタイムと称することがある。

#### 【0263】

本明細書において細胞の状態の「判定」は、種々の方法を用いて行うことができる。そのような方法は、数理的処理（例えば、信号処理法、多変量解析など）、経験的処理、位相の変化などを包含するが、それらに限定されない。

#### 【0264】

本明細書において「差分」とは、あるプロファイルについて、コントロールプロファイル（例えば、刺激のない場合）の値を差し引いて提示するような数理的処理をいう。

#### 【0265】

本明細書において「位相」とは、プロファイルについて言及されるとき、そのプロファイルが基準点（通常0とする）より増えているかまたは減っているかを判定し、それぞれ＋または－として表現することおよびそれによる解析をいう。

#### 【0266】

本明細書においてプロファイル（例えば、経時プロファイル）と細胞の状態との「関連付け」とは、あるプロファイル（例えば、経時プロファイル）またはその変化の特定の情報を、細胞の状態に対応付けることをいい、そのような関係を相関関係という。従来、プロファイル（例えば、経時プロファイル）と細胞の状態との間の関連付けることは、実質的に不可能であり、そのような関係は知られていなかったことから、本発明において、そのような関連付けを行うことができることは格別の効果といえる。

#### 【0267】

本明細書において、関連付けは、少なくとも1つのプロファイルまたはその変動と、細胞、組織、臓器または生体の状態の変化（例えば、親和性、薬剤耐性）とを関連付けること、例えば、あるプロファイルまたはその変動と、細胞の状態の少なくとも1つのパラメータとを定量的または定性的に対応付けることによって行うことができる。関連付けに使用される少なくとも1つのプロファイルの数は、関連付けが行うことができる限り少ない数であってよく、通常少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つであり得るがそれらに限定されない。本発明では、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つの少なくとも1つのプロファイルを特定することによって、ほぼすべての細胞を特定するに充分であることが判明した。そのような効果は、点で見ていた従来のプロファイリングまたはアッセイでは予測不可能であったことであり、本発明によって初めてもたらされた格別の効果といえる。このような場合、少なくとも1つのプロファイル（例えば、経時プロファイル）と、細胞の状態とを対応付ける場合は、行列式を利用して数学的処理を行ってもよい。1つの好ましい実施形態において、関連付けに使用する少なくとも1つのプロファイル（例えば、プロモーターに関するプロファイル）の数は少なくとも8つであることが有利であり得る。8種類の増減を観察することで、理論的には256種類の変化に対応付けることができ、生体を構成するといわれる300種類程度の細胞の種類の数をほぼ網羅することができるからである。その意味において、そのような糖鎖構造の種類としては、少なくとも9種類、または少なくとも10種類観察対象に含めるこ

とがさらに有利であり得る。しかし、本発明の技術を用いれば、実質的には、任意の1つの生物学的因子を選択し、プロファイルデータを取得するだけで、その細胞の状態をかなり理解することが可能である。

#### 【0268】

相関付けの具体的方法としては、例えば、信号処理法（ウェーブレットなどによる）、多変量解析（クラスター解析など）などを利用する方法が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0269】

相関付けは、あらかじめ行ってもよいが、細胞の判定ごとにコントロールを使用し行ってもよい。

#### 【0270】

本明細書において「外来因子」とは、ある細胞について言及するとき、その細胞において通常内部に存在しない因子（例えば、物質、エネルギーなど）をいう。本明細書において「因子」としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、電離線、放射線、光、音波などのエネルギー）でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、またはmRNA、RNAiのようなRNAを含む）、ポリサッカライド、オリゴサッカライド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。外来因子は、1つ用いられてもよいが、2つ以上の組み合わせを用いてもよい。本明細書において外来因子としては、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧などが挙げられるがそれらに限定されない。1つの好ましい実施形態において、外来因子は、生体分子または化学合成物であり得る。

#### 【0271】

本明細書において使用される用語「生体分子」とは、生体に関連する分子をいう。本明細書において「生体」とは、生物学的な有機体をいい、動物、植物、菌類、ウイルスなどを含むがそれらに限定されない。従って、本明細書では生体分子は、生体から抽出される分子を包含するが、それに限定されず、生体に影響を与え得る分子であれば生体分子の定義に入る。したがって、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（たとえば、低分子リガンドなど）もまた生体への効果が意図され得るかぎり、生体分子の定義に入る。そのような生体分子には、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカライド、オリゴサッカライド、脂質、低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子など）、これらの複合分子（糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質など）などが包含されるがそれらに限定されない。生体分子にはまた、細胞への導入が企図される限り、細胞自体、組織の一部も包含され得る。通常、生体分子は、核酸、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンなどであり得る。好ましくは、生体分子は、核酸（DNAまたはRNA）またはタンパク質を含む。別の好ましい実施形態では、生体分子は、核酸（例えば、ゲノムDNAまたはcDNA、あるいはPCRなどによって合成されたDNA）である。他の好ましい実施形態では、生体分子はタンパク質であり得る。好ましくは、そのような生体分子は、ホルモンまたはサイトカインであり得る。

#### 【0272】

本明細書において「化学合成物」とは、通常の化学技術を用いて合成され得るすべての物質をいう。そのような合成技術は、当該分野において周知であり、当業者は、適宜そのような技術を組み合わせて化学合成物を製造することができる。

## 【0273】

本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制御作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。本明細書において用いられる「増殖因子」とは、細胞の増殖を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状態の制御因子としても機能することが判明している。サイトカインには、代表的には、インターロイキン類、ケモカイン類、コロニー刺激因子のような造血因子、腫瘍壊死因子、インターフェロン類が含まれる。増殖因子としては、代表的には、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、肝実質細胞増殖因子(HGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)のような増殖活性を有するものが挙げられる。

## 【0274】

本明細書において使用される「ホルモン」とは、当該分野において通常用いられる最も広い意味と同じ意味で用いられ、動植物の特定の器官または細胞で作られ、産出される部位からは隔たった器官にその特異的な生理作用をあらわす生理的有機化合物をいう。そのようなホルモンとしては、成長ホルモン、性ホルモン、甲状腺ホルモンなどが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなホルモンは、一部、上記サイトカインとそのさす範囲が重複し得る。

## 【0275】

本明細書において「アクチン作用物質」とは、細胞内のアクチンに対して直接的または間接的に相互作用して、アクチンの形態または状態を変化させる機能を有する物質をいう。そのような物質としては、例えば、細胞外マトリクスタンパク質(例えば、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンなど)が挙げられるがそれらに限定されない。そのようなアクチン作用物質には、以下のようなアッセイによって同定される物質が含まれる。本明細書において、アクチンへの相互作用の評価は、アクチン染色試薬(Molecular Probes, Texas Red-X phalloidin)などによりアクチンを可視化した後、顕鏡し、アクチン凝集や細胞伸展を観察することによってアクチンの凝集、再構成および/または細胞伸展速度の向上という現象が確認されることによって判定される。これらの判定は、定量的または定性的に行われ得る。このようなアクチン作用物質は、トランスフェクションの効率を上昇させるために本発明において利用される。本発明において用いられるアクチン作用物質が生体に由来する場合、その由来は何でもよく、例えば、ヒト、マウス、ウシなどの哺乳動物種があげられる。

## 【0276】

本明細書において「細胞接着因子」もしくは「細胞接着分子」(Cell adhesion molecule)または「接着因子」もしくは「接着分子」とは、互換可能に使用され、2つ以上の細胞の互いの接近(細胞接着)または基質と細胞との間の接着を媒介する分子をいう。一般には、細胞と細胞の接着(細胞間接着)に関する分子(cell-cell adhesion molecule)と、細胞と細胞外マトリクスとの接着(細胞-基質接着)に関与する分子(cell-substrate adhesion molecule)に分けられる。本発明の組織片では、いずれの分子も有用であり、有効に使用することができる。従って、本明細書において細胞接着分子は、細胞-基質接着の際の基質側のタンパク質を包含するが、本明細書では、細胞側のタンパク質(例えば、インテグリンなど)も包含され、タンパク質以外の分子であっても、細胞接着を媒介する限り、本明細書における細胞接着分子または細胞接着分子の概念に入る。

## 【0277】



細胞間接着に関しては、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する多くの分子（NCAM、L1、ICAM、ファシクリンII、IIIなど）、セレクトリンなどが知られており、それぞれ独特な分子反応により細胞膜を結合させることも知られている。

#### 【0278】

他方、細胞-基質接着のために働く主要な細胞接着分子はインテグリンで、細胞外マトリックスに含まれる種々のタンパク質を認識し結合する。これらの細胞接着分子はすべて細胞膜表面にあり、一種のレセプター（細胞接着受容体）とみなすこともできる。従って、細胞膜にあるこのようなレセプターもまた本発明の組織片において使用することができる。そのようなレセプターとしては、例えば、 $\alpha$ インテグリン、 $\beta$ インテグリン、CD44、シンデカンおよびアグリカンなどが挙げられるがそれに限定されない。細胞接着に関する技術は、上述のもののほかの知見も周知であり、例えば、細胞外マトリックス-臨床への応用-メディカルレビュー社に記載されている。

#### 【0279】

ある分子が細胞接着分子であるかどうかは、生化学的定量（SDS-PAGE法、標識コラーゲン法）、免疫学的定量（酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討）PDR法、ハイブリダイゼーション法などのようなアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。このような細胞接着分子としては、コラーゲン、インテグリン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリー（例えば、CD2、CD4、CD8、ICM1、ICAM2、VCAM1）、セレクトリン、カドヘリンなどが挙げられるがそれに限定されない。このような細胞接着分子の多くは、細胞への接着と同時に細胞間相互作用による細胞活性化の補助シグナルを細胞内に伝達する。そのような補助シグナルを細胞内に伝達することができるかどうかは、生化学的定量（SDS-PAGE法、標識コラーゲン法）、免疫学的定量（酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討）PDR法、ハイブリダイゼーション法というアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。

#### 【0280】

細胞接着分子としては、例えば、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリー分子（CD2、LFA-3、ICAM-1、CD2、CD4、CD8、ICM1、ICAM2、VCAM1など）；インテグリンファミリー分子（LFA-1、Mac-1、gpIbIIIIa、p150、95、VLA1、VLA2、VLA3、VLA4、VLA5、VLA6など）；セレクトリンファミリー分子（L-セレクトリン、E-セレクトリン、P-セレクトリンなど）などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0281】

本明細書において「細胞外マトリクスタンパク質」とは「細胞外マトリクス」のうちタンパク質であるものをいう。本明細書において「細胞外マトリクス」（ECM）とは「細胞外基質」とも呼ばれ、当該分野において通常用いられる意味と同様の意味で用いられ、上皮細胞、非上皮細胞を問わず体細胞（somatic cell）の間に存在する物質をいう。細胞外マトリクスは、組織の支持だけでなく、すべての体細胞の生存に必要な内部環境の構成に関与する。細胞外マトリクスは一般に、結合組織細胞から産生されるが、一部は上皮細胞や内皮細胞のような基底膜を保有する細胞自身からも分泌される。線維成分とその間を満たす基質とに大別され、線維成分としては膠原線維および弾性線維がある。基質の基本構成成分はグリコサミノグリカン（酸性ムコ多糖）であり、その大部分は非コラーゲン性タンパクと結合してプロテオグリカン（酸性ムコ多糖-タンパク複合体）の高分子を形成する。このほかに、基底膜のラミニン、弾性線維周囲のマイクロフィブリル（microfibril）、線維、細胞表面のフィブロネクチンなどの糖タンパクも基質に含まれる。特殊に分化した組織でも基本構造は同一で、例えば硝子軟骨では軟骨芽細胞によって特徴的に大量のプロテオグリカンを含む軟骨基質が産生され、骨では骨芽細胞によって石灰沈着が起こる骨基質が産生される。従って、本発明において用いられる細胞外マトリクスとしては、例えば、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミ

ノグリカン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、弾性繊維、膠原繊維などが挙げられるがそれに限定されない。

#### 【0282】

本明細書において「レセプター」とは、細胞上または核内などに存在し、外界からの因子または細胞内の因子に対する結合能を有し、その結合によりシグナルが伝達される分子をいう。レセプターは通常タンパク質の形態をとる。レセプターの結合パートナーは、通常リガンドという。

#### 【0283】

本明細書において「アゴニスト」とは、ある生体作用物質（リガンド）のレセプターに結合し、その物質のもつ作用と同じ（あるいは類似の）作用を現わす因子をいう。

#### 【0284】

本明細書において「アンタゴニスト」とは、ある生体作用物質（リガンド）のレセプターへの結合に拮抗的に働き、それ自身はそのレセプターを介した生理作用を現わさない因子をいう。拮抗薬、遮断剤（ブロッカー）、阻害剤（インヒビター）などもこのアンタゴニストに包含される。

#### 【0285】

（デバイス・固相支持体）

本明細書において「デバイス」とは、装置の一部または全部を構成することができる部分をいい、支持体（好ましくは固相支持体）およびその支持体に担持されるべき標的物質などから構成される。そのようなデバイスとしては、チップ、アレイ、マイクロタイタープレート、細胞培養プレート、シャーレ、フィルム、ビーズなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0286】

本明細書において使用される「支持体」は、生体分子のような物質を固定することができる材料（material）をいう。支持体の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子のような物質に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。

#### 【0287】

支持体として使用するためのそのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、ポリスチレン、セルロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）などが挙げられるがそれらに限定されない。支持体は、複数の異なる材料の層から形成されていてもよい。例えば、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスファイト、酸化珪素、炭化珪素、窒化珪素などの無機絶縁材料を使用することができる。ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホンなどの有機材料を用いることができる。本発明においてはまた、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、P V D F 膜など、プロットイングに使用される膜を用いることもできる。支持体を構成する材料が固相である場合、本明細書において特に「固相支持体」という。本明細書において、プレート、マイクロウェルプレート、チップ、スライドガラス、フィルム、ビーズ、金属（表面）などの形態をとり得る。支持体はコーティングされていてもよく、コーティングされていなくてもよい。

#### 【0288】

本明細書において「液相」とは、当該分野において通常用いられる意味と同じ意味で用



いられ、通常、溶液中での状態をいう。

【0289】

本明細書において「固相」とは、当該分野において用いられる意味と同じ意味で用いられ、通常、固体の状態をいう。本明細書において液体および固体を総合して流体ということがある。

【0290】

本明細書において使用される「基板」とは、本発明のチップまたはアレイが構築される材料（好ましくは固体）をいう。したがって、基板はプレートの概念に包含される。基板の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。

【0291】

プレートおよび基板として使用するためのそのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、ポリスチレン、セルロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）が挙げられるがそれらに限定されない。基板は、複数の異なる材料の層から形成されていてもよい。例えば、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスフェイト、炭化珪素、酸化珪素、窒化珪素などの無機絶縁材料を使用できる。また、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホン等の有機材料を用いることができる。基板として好ましい材質は、測定機器などの種々のパラメータによって変動し、当業者は、上述のような種々の材料から適切なものを適宜選択することができる。トランスフェクションアレイのためには、スライドガラスが好ましい。好ましくは、そのような基材は、コーティングされ得る。

【0292】

本明細書において「コーティング」とは、固相支持体または基板について用いられるとき、その固相支持体または基板の表面上にある物質の膜を形成させることおよびそのような膜をいう。コーティングは種々の目的で行われ、例えば、固相支持体および基板の品質向上（例えば、寿命の向上、耐酸性などの耐環境性の向上）、固相支持体または基板に結合されるべき物質の親和性の向上などを目的とすることが多い。そのようなコーティングのための物質としては、種々の物質が用いられ得、上述の固相支持体および基板自体に使用される物質のほか、DNA、RNA、タンパク質、脂質などの生体物質、ポリマー（例えば、ポリ-L-リジン、MAS（松浪硝子、岸和田、日本から入手可能）、疎水性フッ素樹脂）、シラン（APS（例えば、γ-アミノプロピルシラン））、金属（例えば、金など）が使用され得るがそれらに限定されない。そのような物質の選択は当業者の技術範囲内にあり、当該分野において周知の技術を用いて場合ごとに選択することができる。一つの好ましい実施形態では、そのようなコーティングは、ポリ-L-リジン、シラン、（例えば、エポキシシランまたはメルカプトシラン、APS（γ-アミノプロピルシラン））、MAS、疎水性フッ素樹脂、金のような金属を用いることが有利であり得る。このような物質は、細胞または細胞を含む物体（例えば、生体、臓器など）に適合する物質を用いることが好ましい。

【0293】

本明細書において「チップ」または「マイクロチップ」は、互換可能に用いられ、多様の機能をもち、システムの一部となる超小型集積回路をいう。チップとしては、例えば、DNAチップ、プロテインチップなどが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0294】

本明細書において「アレイ」とは、1以上（例えば、1000以上）の標的物質を含む組成物（例えば、DNA、タンパク質、トランスフェクト混合物）が整列されて配置されたパターンまたはパターンを有する基板（例えば、チップ）そのものをいう。アレイの中で、小さな基板（例えば、10×10mm上など）上にパターン化されているものはマイクロアレイというが、本明細書では、マイクロアレイとアレイとは互換可能に使用される。従って、上述の基板より大きなものにパターン化されたものでもマイクロアレイと呼ぶことがある。例えば、アレイはそれ自身固相表面または膜に固定されている所望のトランスフェクト混合物のセットで構成される。アレイは好ましくは同一のまたは異なる抗体を少なくとも $10^2$ 個、より好ましくは少なくとも $10^3$ 個、およびさらに好ましくは少なくとも $10^4$ 個、さらにより好ましくは少なくとも $10^5$ 個を含む。これらの抗体は、好ましくは表面が125×80mm、より好ましくは10×10mm上に配置される。形式としては、96ウェルマイクロタイタープレート、384ウェルマイクロタイタープレートなどのマイクロタイタープレートの大きさのものから、スライドガラス程度の大きさのものが企図される。固定される標的物質を含む組成物は、1種類であっても複数種類であってもよい。そのような種類の数は、1個～スポット数までの任意の数であり得る。例えば、約10種類、約100種類、約500種類、約1000種類の標的物質を含む組成物が固定され得る。

## 【0295】

基板のような固相表面または膜には、上述のように任意の数の標的物質（例えば、抗体のようなタンパク質）が配置され得るが、通常、基板1つあたり、 $10^8$ 個の生体分子まで、他の実施形態において $10^7$ 個の生体分子まで、 $10^6$ 個の生体分子まで、 $10^5$ 個の生体分子まで、 $10^4$ 個の生体分子まで、 $10^3$ 個の生体分子まで、または $10^2$ 個の生体分子までの個の生体分子が配置され得るが、 $10^8$ 個の生体分子を超える標的物質を含む組成物が配置されていてもよい。これらの場合において、基板の大きさはより小さいことが好ましい。特に、標的物質を含む組成物（例えば、抗体のようなタンパク質）のスポットの大きさは、単一の生体分子のサイズと同じ小さくあり得る（これは、1-2nmの桁であり得る）。最小限の基板の面積は、いくつかの場合において基板上の生体分子の数によって決定される。本発明では、細胞への導入が企図される標的物質を含む組成物は、通常、0.01mm～10mmのスポット状に共有結合あるいは物理的相互作用によって配列固定されている。

## 【0296】

アレイ上には、生体分子の「スポット」が配置され得る。本明細書において「スポット」とは、標的物質を含む組成物の一定の集合をいう。本明細書において「スポットティング」とは、ある標的物質を含む組成物のスポットをある基板またはプレートに作製することをいう。スポットティングはどのような方法でも行うことができ、例えば、ピペッティングなどによって達成され得、あるいは自動装置で行うこともでき、そのような方法は当該分野において周知である。

## 【0297】

本明細書において使用される用語「アドレス」とは、基板上のユニークな位置をいい、他のユニークな位置から弁別可能であり得るものをいう。アドレスは、そのアドレスを伴うスポットとの関連づけに適切であり、そしてすべての各々のアドレスにおける存在物が他のアドレスにおける存在物から識別され得る（例えば、光学的）、任意の形状を採り得る。アドレスを定める形は、例えば、円状、楕円状、正方形、長方形であり得るか、または不規則な形であり得る。したがって、「アドレス」は、抽象的な概念を示し、「スポット」は具体的な概念を示すために使用され得るが、両者を区別する必要がない場合、本明細書においては、「アドレス」と「スポット」とは互換的に使用され得る。

## 【0298】

各々のアドレスを定めるサイズは、とりわけ、その基板の大きさ、特定の基板上のアドレスの数、標的物質を含む組成物の量および／または利用可能な試薬、微粒子のサイズお

よびそのアレイが使用される任意の方法のために必要な解像度の程度に依存する。大きさは、例えば、1-2 nmから数cmの範囲であり得るが、そのアレイの適用に一致した任意の大きさが可能である。

#### 【0299】

アドレスを定める空間配置および形状は、そのマイクロアレイが使用される特定の適用に適合するように設計される。アドレスは、密に配置され得、広汎に分散され得るか、または特定の型の分析物に適切な所望のパターンへとサブグループ化され得る。

#### 【0300】

マイクロアレイについては、ゲノム機能研究プロトコル（実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座1）、ゲノム医科学とこれからのゲノム医療（実験医学増刊）などに広く概説されている。

#### 【0301】

マイクロアレイから得られるデータは膨大であることから、クローンとスポットとの対応の管理、データ解析などを行うためのデータ解析ソフトウェアが重要である。そのようなソフトウェアとしては、各種検出システムに付属のソフトウェアが利用可能である（Ermolaeva Oら（1998）Nat. Genet. 20:19-23）。また、データベースのフォーマットとしては、例えば、Affymetrixが提唱しているGATC（genetic analysis technology consortium）と呼ばれる形式が挙げられる。

#### 【0302】

微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). Fundamentals of Microfabrication, CRC Press; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithographyなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

#### 【0303】

（検出）

本発明の細胞分析または判定方法では、細胞またはそれに相互作用する物質に起因する情報を検出することができる限り、種々の検出方法および検出手段を用いることができる。そのような検出方法および検出手段としては、例えば、目視、光学顕微鏡、共焦点顕微鏡、蛍光顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴（SPR）イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる方法および手段を挙げることができるがそれらに限定されない。そのような検出装置としてはまた、蛍光分析装置、分光光度計、シンチレーションカウンター、CCD、ルミノメーターなども挙げられるがそれらに限定されず、生体分子を検出することができる手段であればどのようなものでもよい。

#### 【0304】

本明細書において「マーカー」とは、目的とする物質または状態についてレベルまたは頻度を反映する生物学的因子をいう。そのようなマーカーとしては、例えば、遺伝子をコードする核酸、遺伝子産物、代謝産物、レセプター、リガンド、抗体などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0305】

したがって、本明細書において細胞の状態に関連するマーカーとは、転写制御因子のほか、細胞の状態を示す細胞内因子（例えば、遺伝子をコードする核酸、遺伝子産物（例え

ば、mRNA、タンパク質、翻訳後修飾タンパク質)、代謝産物、レセプターなど) に対して相互作用する因子(例えば、リガンド、抗体など、相補的な核酸)などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、このようなマーカーについて経時プロファイルを生成して解析することも包含する。そのようなマーカーは、好ましくは、目的とする因子に対して特異的に相互作用することが有利であり得る。そのような特異性は、例えば、類似の分子よりも目的の分子に対する相互作用の程度が有意に高い性質を言う。本発明では、好ましくは、そのようなマーカーは、細胞内部に存在するが、細胞外のものであってもよい。

#### 【0306】

本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存在(たとえば、物質、エネルギー、電磁波など)をいう。そのような標識方法としては、RI(ラジオアイソトープ)法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。上記の核酸断片および相補性を示すオリゴヌクレオチドを何れも蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、10nm以上であることが好ましい。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素(例えば、CyDye<sup>TM</sup>シリーズのCy3、Cy5等)、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N2-アセチルアミノフルオレン(AAF)、AAIF(AAFのヨウ素誘導体)等を使用することが好ましい。蛍光発光極大波長の差が10nm以上である蛍光物質としては、例えば、Cy5とローダミン6G試薬との組み合わせ、Cy3とフルオレセインとの組み合わせ、ローダミン6G試薬とフルオレセインとの組み合わせ等を挙げることができる。本発明では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識および目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

#### 【0307】

本明細書において「相互作用」には、疎水性相互作用、親水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、イオン性相互作用、非イオン性相互作用、静電的相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0308】

本明細書において「相互作用のレベル」とは、2つの物質(細胞などを含む)の間の相互作用について言及する場合、その2つの物質の間の相互作用の程度または頻度をいう。そのような相互作用のレベルは、当該分野において周知の方法によって測定することができる。そのような方法としては、例えば、実際に相互作用し固定状態にある細胞の数を、例えば、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相差顕微鏡などを利用して、直接または間接的に(例えば、反射光強度)計数すること、細胞に特異的なマーカー、抗体、蛍光標識などで染色しその強度を測定することなどが挙げられるがそれらに限定されない。これらのレベルは、マーカーから直接または標識を介して間接的に表示することができる。このような測定値から、例えば、あるスポットにおいて実際に転写または発現する遺伝子の個数または頻度を算出することができる。

#### 【0309】

(提示および表示)

本明細書において「表示」および「提示」とは、互換可能に使用され、本発明の方法に従って得られたプロファイルまたはそれに由来する情報を直接または間接的にあるいは情報処理をした形態で具現化することをいう。そのような表示の形態としては、グラフ、写真、表、アニメーションなど種々の方法があり、限定されない。そのような技術としては、例えば、METHODS IN CELL BIOLOGY, VOL. 56, ed. 1998, pp:185-215、A High-Resolution Multimode Digital Microscope System (Sluder & Wolf, Salmon)において、顕微鏡を自動化し、カメラを制御するためのアプリケーションソフトウェアとともに、自動光学顕微鏡の顕微鏡、カメラ、Z軸フォー

カス装置を含む、ハードウェアシステムの設計について議論されており、本発明において利用することができる。カメラによるイメージ取得は、Inoue and Spring, Video Microscopy, 2d. Edition, 1997に詳細に記載されており、本明細書において参考文献として援用される。

#### 【0310】

リアルタイムの表示および提示もまた、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。例えば、全てのイメージが取得され、半永久的メモリに格納された後、あるいはイメージの取得と実質的に同時に、適切なアプリケーションソフトウェアで処理し、処理されたデータを得ることができる。例えば、取得されたデータを処理する方法は、画像が中断されないシーケンスをプレイバックする、あるいは、リアルタイムで表示する、焦点面における変化および連続として、照射光を示す「ムービー」として表示することができる。

#### 【0311】

別の実施形態では、測定および表示用アプリケーションは、通常刺激付与の条件や得られた検出信号の記録条件を設定するためのソフトウェアを含んでいる。この測定および表示用アプリケーションによって、コンピュータは細胞に刺激を付与する手段と、細胞から検出された信号を処理する手段とを構成するだけでなく、光学観察手段（SITカメラ及び画像ファイル装置）および／または細胞培養手段の制御を行うこともできる。

#### 【0312】

パラメータ設定画面では、キーボード、タッチパネルまたはマウスなどを用いて画面上で刺激条件を入力することにより、所望の複雑な刺激条件の設定が可能である。その他、細胞培養の温度、pHなどの諸条件の設定をキーボード、マウスなどを用いて行うことができる。

#### 【0313】

表示画面では、細胞から検出されたプロファイルまたはそれに由来する情報をリアルタイムでまたは記録後に表示する。また、記録された別のプロファイルまたはそれに由来する情報を細胞の顕微鏡像に重ねて表示することもできる。記録情報の表示とともに、記録時の測定パラメータ（刺激条件、記録条件、表示条件、処理条件、細胞の諸条件、温度、pH等）もまたリアルタイムで表示することができる。温度またはpHが許容範囲を外れたときの警報機能も備えられていてもよい。

#### 【0314】

データ解析画面では、種々の数理解析、フーリエ変換、クラスター解析、FFT解析、コヒーレンス解析、コリレーション解析などの条件を設定することが可能である。一時的なプロファイル表示機能、トポグラフィー表示機能、も備えていてもよい。これらの解析結果は、記録媒体に保存されている顕微鏡像に重ねて表示することができる。

#### 【0315】

（遺伝子導入）

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。本明細書では、トランスフェクションが好ましい。

#### 【0316】

本明細書において「トランスフェクション」とは、遺伝子DNA、プラスミドDNA、ウイルスDNA、ウイルスRNAなどを、ウイルス粒子などの形をとらない裸に近い状態で細胞の培養、または細胞の懸濁液に加えて細胞に取り込ませて遺伝子導入または感染を行うことをいう。通常トランスフェクションによって導入された遺伝子は、一過的に細胞において発現するが、永続的に取り込まれる場合もある。

#### 【0317】

そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編（1988）、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New Y

ork, NY; Sambrook Jら (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

#### 【0318】

本明細書において遺伝子操作について言及する場合、「ベクター」または「組み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチブルクローニング部位を含む。そのような制限酵素部位およびマルチブルクローニング部位は、当該分野において周知であり、当業者は、目的に合わせて適宜選択して使用することができる。そのような技術は、本明細書に記載される文献（例えば、Sambrookら、前出）に記載されている。

#### 【0319】

本明細書において「発現ベクター」とは、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、動物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

#### 【0320】

原核細胞に対する組換えベクターとしては、p cDNA3 (+)、p Bluescript-SK (+/-)、p GEM-T、p EF-BOS、p EGFP、p HAT、p UC18、p FT-DEST<sup>TM</sup> 42 GATEWAY (Invitrogen) などが例示される。

#### 【0321】

動物細胞に対する組換えベクターとしては、p cDNA1/Amp、p cDNA1、p CDM8（いずれもフナコシより市販）、p AGE107 [特開平3-229 (Invitrogen)]、p AGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p AMo、p AMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)]、マウス幹細胞ウイルス (Murine Stem Cell Virus) (MSCV) に基づいたレトロウイルス型発現ベクター、p EF-BOS、p EGFPなどが例示される。

#### 【0322】

植物細胞に対する組換えベクターとしては、p PCVICEn4HPT、p CGN1548、p CGN1549、p BI221、p BI121などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0323】

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など（例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）、リポフェクション法、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (19



83) ]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法が挙げられる。

【0324】

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

【0325】

本明細書において「遺伝子導入試薬」とは、遺伝子導入方法において、導入効率を促進するために用いられる試薬をいう。そのような遺伝子導入試薬としては、例えば、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウムなどが挙げられるがそれらに限定されない。トランスフェクションの際に利用される試薬の具体例としては、種々なソースから市販されている試薬が挙げられ、例えば、Effected Transfection Reagent (cat. no. 301425, Qiagen, CA), TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Promega, WI), Tfx™-20 Reagent (E2391, Promega, WI), SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA), LipofectAMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen corporation, CA), JetPEI (×4) conc. (101-30, Polyplus-transfection, France) および ExGen 500 (R0511, Fermentas Inc., MD) などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0326】

本明細書において遺伝子発現(たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現)の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ(例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ)を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、(秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」)に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet. 2002 Dec; 32 Suppl: 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土社(2002)などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

【0327】

「発現量」とは、目的の細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法

を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたは mRNA レベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

**【0328】**

(スクリーニング)

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の方法またはシステムを使用することができる。

**【0329】**

本明細書において、免疫反応を利用してスクリーニングを行うことを、「免疫表現型分類 (immunophenotyping)」ともいう。この場合、本発明の抗体または単鎖抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の転写産物・翻訳産物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および／または成熟の種々の段階で示差的に発現される細胞マーカーとして有用である。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して指向されるモノクローナル抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクローナル抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス（すなわち、プレート）に付着した抗体を用いる「パニング (panning)」、ならびにフローサイトメトリーが挙げられる（例えば、米国特許第 5,985,660 号；および Morrisonら、Cell, 96:737-49 (1999) を参照）。

**【0330】**

これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような細胞増殖および／または分化を起こし得るかまたは未分化状態への改変処置を行ったような細胞集団のような、未分化の細胞（例えば、胚性幹細胞、組織幹細胞など）を含む細胞集団についてスクリーニングするために利用され得る。

**【0331】**

(診断)

本明細書において「診断」とは、被検体における疾患、障害、状態などに関連する種々のパラメータを同定し、そのような疾患、障害、状態の現状を判定することをいう。本発明の方法、装置、システムを用いることによって、糖鎖構造を分析し、薬剤耐性レベルと相関付けることができ、そのような情報を用いて、被検体における疾患、障害、状態、投与すべき処置または予防のための処方物または方法などの種々のパラメータを選定することができる。

**【0332】**

本発明の診断方法は、原則として、身体から出たものを利用することができることから、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることから、産業上有用である。

**【0333】**

(治療)

本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消長させることをいう。

**【0334】**

本明細書において「被検体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。患者または被検体は好ましくは、ヒトであり得る。

**【0335】**

本明細書において「病因」とは、被検体の疾患、障害または状態（本明細書において、総称して「病変」ともいい、植物では病害ともいう）に関連する因子をいい、例えば、原因となる病原物質（病原因子）、病原体、病変細胞、病原ウイルスなどが挙げられるがそ



れらに限定されない。

#### 【0336】

本発明が対象とする「疾患」は、病原遺伝子が関連する任意の疾患であり得る。そのような疾患としては、癌、ウイルスまたは細菌による感染症、アレルギー、高血圧、高脂血症、糖尿病、心臓病、脳梗塞、痴呆症、肥満、動脈硬化性疾患、不妊症、精神神経疾患、白内障、早老症、紫外線放射線過敏症などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0337】

本発明が対象とする「障害」は、病原遺伝子が関連する任意の障害であり得る。

#### 【0338】

そのような疾患、障害または状態の具体例としては、例えば、循環器系疾患（貧血（例えば、再生不良性貧血（特に重症再生不良性貧血）、腎性貧血、がん性貧血、二次性貧血、不応性貧血など）、がんまたは腫瘍（例えば、白血病、多発性骨髄腫）など）；神経系疾患（痴呆症、脳卒中およびその後遺症、脳腫瘍、脊髄損傷など）；免疫系疾患（T細胞欠損症、白血病など）；運動器・骨格系疾患（骨折、骨粗鬆症、関節の脱臼、亜脱臼、捻挫、靱帯損傷、変形性関節症、骨肉腫、ユーイング肉腫、骨形成不全症、骨軟骨異形成症など）；皮膚系疾患（無毛症、黒色腫、皮膚悪性リンパ腫、血管肉腫、組織球症、水疱症、膿疱症、皮膚炎、湿疹など）；内分泌系疾患（視床下部・下垂体疾患、甲状腺疾患、副甲状腺（上皮小体）疾患、副腎皮質・髄質疾患、糖代謝異常、脂質代謝異常、タンパク質代謝異常、核酸代謝異常、先天性代謝異常（フェニルケトン尿症、ガラクトース血症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症）、無アルブミン血症、アスコルビン酸合成能欠如、高ビリルビン血症、高ビリルビン尿症、カリクレイン欠損、肥満細胞欠損、尿崩症、バソプレッシン分泌異常、侏儒症、ウオルマン病（酸リパーゼ（Acid lipase）欠損症）、ムコ多糖症VI型など）；呼吸器系疾患（肺疾患（例えば、肺炎、肺がんなど）、気管支疾患、肺がん、気管支がんなど）；消化器系疾患（食道疾患（たとえば、食道がん）、胃・十二指腸疾患（たとえば、胃がん、十二指腸がん）、小腸疾患・大腸疾患（たとえば、大腸ポリープ、結腸がん、直腸がんなど）、胆道疾患、肝臓疾患（たとえば、肝硬変、肝炎（A型、B型、C型、D型、E型など）、劇症肝炎、慢性肝炎、原発性肝がん、アルコール性肝障害、薬物性肝障害）、脾臓疾患（急性脾炎、慢性脾炎、脾臓がん、嚢胞性脾疾患）、腹膜・腹壁・横隔膜疾患（ヘルニアなど）、ヒルシュスプラング病など）；泌尿器系疾患（腎疾患（腎不全、原発性糸球体疾患、腎血管障害、尿細管機能異常、間質性腎疾患、全身性疾患による腎障害、腎がんなど）、膀胱疾患（膀胱炎、膀胱がんなど）など）；生殖器系疾患（男性生殖器疾患（男性不妊、前立腺肥大症、前立腺がん、精巣がんなど）、女性生殖器疾患（女性不妊、卵巣機能障害、子宮筋腫、子宮腺筋症、子宮がん、子宮内膜症、卵巣がん、絨毛性疾患など）など）；循環器系疾患（心不全、狭心症、心筋梗塞、不整脈、弁膜症、心筋・心膜疾患、先天性心疾患（たとえば、心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、ファロー四徴）、動脈疾患（たとえば、動脈硬化、動脈瘤）、静脈疾患（たとえば、静脈瘤）、リンパ管疾患（たとえば、リンパ浮腫）など）などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0339】

本明細書において「がん」または「癌」は、互換可能に用いられ、異型性が強く、増殖が正常細胞より速く、周囲組織に破壊性に浸潤し得あるいは転移をおこし得る悪性腫瘍またはそのような悪性腫瘍が存在する状態をいう。本発明においては、がんは固形がんおよび造血器腫瘍を含むがそれらに限定されない。

#### 【0340】

本明細書において「固形がん」は、固形の形状があるがんをいい、白血病などの造血器腫瘍とは対峙する概念である。そのような固形がんとしては、例えば、乳がん、肝がん、胃がん、肺がん、頭頸部がん、子宮頸部がん、前立腺がん、網膜芽細胞腫、悪性リンパ腫、食道がん、脳腫瘍、骨腫瘍が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0341】

本明細書において「がん治療」は、抗がん剤（例えば、化学療法剤、放射線治療など）

を投与することによって行われるか、または外科的に除去などをする外科的治療を包含する。

#### 【0342】

本明細書において用いられる化学療法剤は、当該分野において周知であり、抗がん剤マニュアル第2版 塚越茂他編 中外医学社; Pharmacology; Lippincott Williams & Wilkins, Inc. に記載されている。そのような化学療法剤は、例えば、以下が挙げられるがそれに限定されない: 1) アルキル化剤 (DNA, タンパク質などの細胞構成成分をアルキル化して細胞毒性を示す。例えば、シクロホスファミド、ブスルファン、チオテパ、ダカルバジンが挙げられるがそれらに限定されない); 2) 代謝拮抗剤 (おもに核酸の合成を阻害する薬剤 (例えば、葉酸代謝拮抗剤としてメトトレキサートなど、プリン代謝拮抗剤として6-メルカプトプリンなど、ピリミジン代謝拮抗剤としてフルオロウラシル (5-FU) など); 3) DNAトポイソメラーゼ阻害剤 (例えば、カンプトテシン、エトポシド (それぞれトポイソメラーゼI、IIを阻害する)); 4) チューブリン作用薬 (微小管形成を阻害し、細胞分裂を抑制する。ビンブラスチン、ビンクリスチンなど); 5) 白金化合物 (DNAおよびタンパク質との結合による細胞毒性を示す。シスプラチン、カルボプラチンなど); 6) 抗がん抗生物質 (DNAと結合し、DNA合成、RNA合成を阻害する。アドリアマイシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシンなど); 7) ホルモン剤 (乳がん、子宮がん、前立腺がんなどホルモン依存性のがんに適応。タモキシフェン、リユープロレリン (LHRH) など); 8) 生物製剤 (アスパラギン要求性血液悪性腫瘍に対して有効なアスパラギナーゼ、直接的な抗腫瘍作用と免疫増強による間接作用を示すインターフェロンなどがある); 9) 免疫賦活剤 (免疫応答能を増強し、間接的に抗腫瘍活性を示す。シイタケ由来の多糖体であるレンチナン、微生物由来のペプチドであるベスタチンなど)。

#### 【0343】

本明細書において「抗がん剤」とは、がん (腫瘍) 細胞の増殖を選択的に抑制し、がんの薬剤および放射線治療の両方を包含する。そのような抗がん剤は当該分野において周知であり、例えば、抗がん剤マニュアル第2版 塚越茂他編 中外医学社; Pharmacology; Lippincott Williams & Wilkins, Inc. に記載されている。

#### 【0344】

本明細書において「放射線療法」または「放射線治療」とは、互換可能に使用され、電離放射線または放射性物質を利用した疾患の治療をいう。代表的な放射線療法としては、X線、γ線、電子線、陽子線、重粒子線、中性子捕捉療法が挙げられるがそれに限定されない。好ましい放射線療法としては、重粒子線が挙げられる。重粒子線を用いた療法は装置が大きく一般的でないことがある。そのような放射線療法は当該分野において周知であり、例えば、放射線検査と治療の基礎; 放射線治療と集学的治療: 邵啓全 (滋賀医大 放射線): 総合消化器ケア 6巻 6号 Page 79-89, 6-7 (2002.02) に記載されている。本発明において同定される薬剤耐性は、通常化学療法が想定されるが、放射線療法による耐性もまたプロファイルと関連付けられることから、本明細書では、放射線療法は薬剤の概念の中に入る。

#### 【0345】

本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない: 抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または農学的もしくは薬学的アジュバント。

#### 【0346】

本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報 (例えば、薬剤耐性レベルに関する情報) を元に、使用目的、対象疾患 (種類

、重篤度など)、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被検体(または患者)に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。薬剤を投与する頻度あるいは薬剤耐性をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日-数ヶ月に1回(例えば、1週間に1回-1ヶ月に1回)の投与が挙げられる。1週間-1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

#### 【0347】

本明細書において「指示書」は、本発明のテイラーメイド治療方法などを医師、患者など投与を行う人に対して記載したものである。この指示書は、本発明の医薬などを例えば、放射線治療直後または直前(例えば、24時間以内など)に投与することを指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁(例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局(FDA)など)が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書(package insert)であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体(例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール)のような形態でも提供され得る。

#### 【0348】

必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための薬剤耐性レベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。

#### 【0349】

本発明ではまた、得られた薬剤耐性に関する情報を元に、遺伝子治療を施すことも可能である。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

#### 【0350】

本発明では、いったん類似の種類(例えば、ヒトに対するマウスなど)の生物に関し、ある特定のプロファイルの分析結果と、細胞の状態とが相関付けられた場合、対応するプロファイルの分析結果と、細胞の状態とが相関付けることができることは、当業者は容易に理解する。そのような事項は、例えば、動物培養細胞マニュアル、瀬野ら編著、共立出版、1993年などに記載され支持されており、本明細書においてこのすべての記載を援用する。

#### 【0351】

本発明はまた、遺伝子治療に応用され得る。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

#### 【0352】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法が、本発明に従って使用され得る。例示的な方法は、以下のとおりである。

#### 【0353】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5):155-215 (1993)を参照の

こと。遺伝子治療において使用される一般的に公知の組換えDNA技術は、Ausubelら(編), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) に記載される。

#### 【0354】

##### (基本技術)

本明細書において使用される技術は、そうではないと具体的に指示しない限り、当該分野の技術範囲内にある、マイクロフルイディクス、微細加工、有機化学、生化学、遺伝子工学、分子生物学、微生物学、遺伝学および関連する分野における周知慣用技術を使用する。そのような技術は、例えば、以下に列挙した文献および本明細書において他の場所において引用した文献においても十分に説明されている。

#### 【0355】

微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). Fundamentals of Microfabrication, CRC Press; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithographyなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

#### 【0356】

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Curr

ent Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

#### 【0357】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

#### 【0358】

（遺伝子の同時調節の解析）

本明細書において用いられる数理処理は、例えば、生命システム解析のための数学、コロナ社、清水和幸（1999）などにおいて記載される周知技術を適用することができる。以下にそのようなもののなかから代表的な解析手法を説明する。

#### 【0359】

1つの実施形態では、そのような数理処理は、回帰分析であり得る。回帰分析としては、線形回帰（単回帰分析法、重回帰分析法、ロバスト推定法などが挙げられる）、非線形推定法などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0360】

単回帰分析法では、 $n$ 組のデータ  $(x_1, y_1) \sim (x_n, y_n)$  のデータ組を、 $y_i = ax_i + b + e_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) にフィットさせることによって分析が行われる。ここで、 $a$  および  $b$  は、モデルパラメータであり、 $e_i$  は直線からのずれまたは誤差である。ここで、データ点と直線との垂直方向の距離の二乗和の平均値が最小となるように  $a$  および  $b$  を決めるという分析が通常行われる。このような場合、偏微分をして、連立一次方程式を立て、これを解くことによって、二乗誤差を最低にする値が求められる。このような値を、最小二乗推定値という。

#### 【0361】

次に、それぞれのデータから平均値を引いた値に対して回帰直線を求める。回帰直線として

$$A \sum_i X_i + B = \sum Y_i$$

というものを想定し、 $B = 0$  を仮定した場合の回帰直線を求めることができる。このとき、 $(x_i, y_i)$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) の中からそれぞれの平均値 ( $x_{ave}$  および  $y_{ave}$ ) を求め、 $x$  の分散  $s_{xx}$  および  $x$ 、 $y$  の共分散  $s_{xy}$  を求め、次式により回帰直線を求めることができる。

#### 【0362】

$$y - y_{ave} = (s_{xy} / s_{xx}) (x - x_{ave})。$$

## 【0363】

ここで、 $r_{xy}$  を相関係数とすると、  
 $\sum e_i^2 / n = s_{yy} (1 - r_{xy}^2)$  の関係があることから、 $|r_{xy}|$  が 1 に近いほど、誤差は少なく、データは回帰直線でよく表せることを意味する。ここで、 $r_{xy} = s_{xy} / \sqrt{(s_{xx} s_{yy})}$  である。

## 【0364】

別の実施形態において使用される重回帰分析法は、 $y$  が 1 つの独立変数ではなく、2 つまたはそれ以上の変数の関数と考えられ、例えば、

$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_n x_n$$

であらわされるような式で表され、これを重回帰式という。ここで、 $a_0$  などは(偏) 回帰係数と呼ばれる。重回帰分析法では、最小二乗法を適用して、正規方程式を解くことによって、重みつき最小二乗推定が求められる。ここでも単回帰分析と同様の評価を行うことが可能である。

## 【0365】

別の実施形態において、ロバスト推定法が用いられる。最小二乗法は、測定値に偏りがなく、その測定誤差が正規分布をし、モデルにも近似の誤差がないという前提に基づいている。しかし、ここでは、実際の測定ミス、単純ミスなどがあり得ることから、そのような信頼できないデータを、大多数の信頼できるデータから、アウトライヤー (outlier) として検出して除いたり、または統計処理をすることをロバスト推定法という。このようなロバスト推定法もまた、本発明において利用され得る。

## 【0366】

非線形推定法もまた本明細書において用いられ得る。このような非線形推定法では、非線形モデルをベクトル方程式として表して解を求めることが可能である。

## 【0367】

本発明において用いられる数値処理としては、このほかに、主成分分析法、があり、二次元データの主成分分析、多次元データの主成分分析、特異値分解、一般化逆行列を利用する。あるいは、正準相関分析法、因子分析法、判別分析法、クラスター分析法などが利用され得る。

## 【0368】

(クラスター分析による遺伝子セット分類)

多くの用途に対して、広範な条件にわたって共同で制御される基準転写制御配列のセットを見出すことが所望され得る。このような基準転写制御配列セットを同定する実施形態としては、クラスター化アルゴリズムが挙げられる(クラスター化アルゴリズムの概説は、例えば、Fukunaga, 1990, Statistical Pattern Recognition, 2nd ed., Academic Press, San Diego; Anderberg, 1973, Cluster Analysis for Applications, Academic Press: New York; Everitt, 1974, Cluster Analysis, London: Heinemann Educ. Books; Hartigan, 1975, Clustering Algorithms, New York: Wiley; Sneathおよび Sokal, 1973, Numerical Taxonomy, Freemanを参照)。

## 【0369】

転写制御配列セットは、転写制御機構に基づいて定義することもできる。調節領域に同一または類似の配列の転写因子結合部位を有している転写制御配列は、共同調節されやすい。ある好ましい実施態様では、目的とする転写制御配列の調節領域を、多重アラインメント分析を用いて比較し、可能な共有転写因子結合部位を解読することができる (Storino and Hartzell, 1989, Identifying protein binding sites from unaligned DNA fragments, Proc Natl Acad Sci 86:1183-1187;

Hertz and Stormo, 1995, Identification of consensus patterns in unaligned DNA and protein sequences: a large-deviation statistical basis for penalizing gaps, Proc of 3rd Intl Conf on Bioinformatics and Genome Research, Lim and Cantor編, World Scientific Publishing Co., Ltd. Singapore, pp. 201-216)。

#### 【0370】

種々の条件にわたって共同調節される基本的な生物学的因子のセットを見出すことが所望され得る。これにより、本発明の方法が、効率よくプロファイルに基づく判定において十分に機能するようになる。このような基本的な生物学的因子のセットを同定するための好ましい実施形態はクラスター化アルゴリズムを含む

クラスター分析を用いる実施形態において、生物学的サンプルに種々の刺激を施しながら、多数の生物学的因子の状態をモニターすることができる。生物学的因子の状態の測定を含むデータの表がクラスター分析に用いられる。種々の条件にわたって同時変化する生物学的因子を含む基本生物学的因子セットを得るためには、通常少なくとも2、好ましくは少なくとも3つ、より好ましくは少なくとも10、さらに好ましくは50を超え、最も好ましくは100を超える刺激または条件を用いる。クラスター分析は $m \times k$ 次元を有するデータの表に対して行い、ここで $m$ は条件または刺激の合計数であり、かつ $k$ は測定する生物学的因子の数である。

#### 【0371】

多くのクラスター化アルゴリズムがクラスター化分析に有用である。クラスター化アルゴリズムは、クラスターを形成する場合に、対象間の相違点または距離を用いる。ある実施形態においては、用いられる距離は多次元空間におけるユークリッド距離:

#### 【0372】

##### 【数1】

$$I(x, y) = \left\{ \sum_i (X_i - Y_i)^2 \right\}^{1/2}$$

であり、式中 $I(x, y)$ は遺伝子 $X$ と遺伝子 $Y$ との（または、あらゆる他の細胞構成要素（例えば、生物学的因子） $X$ と $Y$ との）距離であり； $X_i$ および $Y_i$ は刺激 $i$ の下での遺伝子発現応答である。ユークリッド距離を平方してさらに遠隔の対象に徐々に大きくなる重みをかけることができる。その代わりに、距離基準は、例えば生物学的因子 $X$ と生物学的因子 $Y$ との間の、マンハッタン距離であってもよく、これは:

#### 【0373】

##### 【数2】

$$I(x, y) = \sum_i |X_i - Y_i|$$

によって与えられる。ここでもやはり、 $X_i$ および $Y_i$ は刺激 $i$ の下での生物学的因子または遺伝子発現応答である。他の幾つかの距離の定義は、チェビシェフ距離、パワー距離および不一致率である。次元のデータが自然のままでカテゴリー的である場合、 $I(x, y) = (X_i \neq Y_i \text{ の数}) / i$ として定義される不一致率が本発明の方法において利用され得る。このような方法は、細胞応答に関連して特に有用である、他の有用な距離定義は $I$



= 1 - r であり、式中 r は応答ベクトル X、Y 間の相関係数であって、正規化内積  $X \cdot Y / |X| |Y|$  とも呼ばれる。具体的には、内積  $X \cdot Y$  は式：

【0374】

【数3】

$$X \cdot Y = \sum_i X_i \times Y_i$$

によって定義され、かつ  $|X| = (X \cdot X)^{1/2}$ 、 $|Y| = (Y \cdot Y)^{1/2}$  である。

【0375】

最も好ましくは、距離基準を、例えば、同時変化するおよび／または同時調節される細胞構成要素（同時変化するまたは同時調節される生物学的因子など）を同定するために、問題となっている生物学的問題点に適合させる。例えば、特に好ましい実施形態において、距離は、遺伝子 X および Y の加重内積を含む相関係数を有する  $I = 1 - r$  を基準とする。具体的には、この好ましい実施形態において、 $r$  は好ましくは以下に示す式：

【0376】

【数4】

$$r = \frac{\sum_i \frac{x_i y_i}{\sigma_i^{(x)} \sigma_i^{(y)}}}{\left[ \sum_i \left( \frac{x_i}{\sigma_i^{(x)}} \right)^2 \left( \frac{y_i}{\sigma_i^{(y)}} \right)^2 \right]^{1/2}}$$

によって定義される。式中、 $\sigma_i^{(x)}$  および  $\sigma_i^{(y)}$  は、実験 i における遺伝子 X および Y の測定とそれぞれ関連する標準誤差である。

【0377】

上記正規および加重内積の相関係数は、値 +1（2つの応答ベクトルが完全に相関し、本質的に同一であることを示す）と -1（2つの応答ベクトルが「相関していない」または「同一方向を向いていない」（すなわち反対を向いている）ことを示す）との間に拘束される。これらの相関係数は、細胞構成要素（例えば、生物学的因子、転写制御配列）セットまたはクラスターが同じ兆候の応答を有する細胞構成要素（例えば、生物学的因子、転写制御配列）を求める本発明の実施形態に特に好ましい。

【0378】

他の実施形態において、同じ生物学的応答または経路を同時調節するかまたはそれに関与しているが、類似しかつ非相関の応答を含む細胞構成要素（例えば、生物学的因子、転写制御配列）のセットまたはクラスターを同定することが好ましい。このような実施形態においては、上述の正規化または加重内積のいずれかの絶対値、すなわち  $|r|$  を相関係数として使用することが好ましい。

【0379】

さらに他の実施形態においては、同時調節されるおよび／または同時変化する細胞構成要素（生物学的因子、転写制御配列など）の間の関係はさらに複雑であり、多数の生物学的経路（例えばシグナル伝達経路）が同じ細胞構成要素（例えば、生物学的因子、転写制御配列）に集まり、異なる結果を出すような例がある。そのような実施形態においては、同時変化するおよび／または同時調節される細胞構成要素（変化に関与しないコントロールとしての別の生物学的因子、転写制御配列）を同定することができる、相関係数  $r = r^{(変化)}$  を用いることが好ましい。以下の式（数5）に特定される相関係数は、そのような実施形態において特に有用である：

【0380】

## 【数5】

$$r = \frac{\sum_i \left| \frac{x_i}{\sigma_i^{(x)}} \right| \left| \frac{y_i}{\sigma_i^{(y)}} \right|}{\left[ \sum_i \left( \frac{x_i}{\sigma_i^{(x)}} \right)^2 \left( \frac{y_i}{\sigma_i^{(y)}} \right)^2 \right]^{1/2}}$$

種々のクラスター連関法則が本発明の方法において有用である。

## 【0381】

このような方法としては、例えば、単一連関法、最近接点法などが挙げられこれらの方法は、2つの最も近い対象物間の距離を測定する。あるいは、本発明において使用され得る完全連関法は、異なるクラスターにある2つの対象物間の最大距離で距離を測定する。この方法は、遺伝子または他の細胞構成要素が天然に別個の「凝集 (clump)」を形成する場合には特に有用である。

## 【0382】

あるいは、非加重ペア群の平均が、2つの異なるクラスターにおける対象物ペア全ての間の平均距離として距離を定義する。この方法もまた、天然に別個の「凝集」を形成する遺伝子または他の細胞構成要素をクラスター化するのに非常に有用である。最後に、加重ペア群平均法も利用可能である。この方法は、それぞれのクラスターのサイズを重みとして使用することを除けば非加重ペア群平均法と同じである。この方法は、生物学的因子などのクラスターのサイズが非常に可変すると疑われる実施形態に特に有用である (SneathおよびSokal, 1973, Numerical taxonomy, San Francisco: W. H. Freeman & Co.). 他のクラスター連関法則、例えば非加重および加重ペア群セントロイドおよびウード法もまた本発明のいくつかの実施形態に有用である。例えば、Ward, 1963, J. Am. Stat. Assn. 58: 236; Hartigan, 1975, Clustering algorithms, New York: Wileyを参照のこと。

## 【0383】

ある好ましい一つの実施形態において、クラスター分析はhclustの周知技術 (例えば、プログラムS-Plus, MathSoft, Inc., Cambridge, MAからの「hclust」の周知の手順を参照のこと) を用いて行うことができる。

## 【0384】

クラスター化セットにおける刺激の多様性が大きくなっても、本発明の方法で解析した場合は、通常少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つのプロファイルを解析しただけで、細胞の状態をほぼ解明することができるということが本発明により見出された。このような刺激条件には、異なる濃度での薬剤処理、処理後の異なる測定時間、種々の遺伝子中の遺伝的変異に対する応答、薬剤処理と変異との組合せ、ならびに増殖条件の変化 (温度、密度、およびカルシウム濃度など) が含まれる。

## 【0385】

本明細書において統計学的に「有意に異なる」とは、2つの統計量について言及される時、統計的有意性を伴って異なることをいう。本発明の実施形態において、実験のセットを横断する各細胞構成要素の応答に関する実験の見出しを、モンテカルロ法で無作為化することにより、客観的試験を定義することができる。

## 【0386】

ある実施形態においては、客観的試験を以下の方法で定義することができる:  $p_{ki}$  を、実験  $i$  における構成要素  $k$  の応答とする。  $\Pi(i)$  を実験のインデックスの無作為並べ替えとする。次いで、多数 (約100~1000) の異なる無作為並べ替えの各々について、  $p_{k\Pi(i)}$  をたてる。元のツリーの各分枝について、各並べ替えに関して: (1) 並べ替えていない元のデータに対して用いたのと同じアルゴリズム (この場合は「h

cluster)) を用いて階層的クラスター化を行う;

(2) 1つのクラスターから2つのクラスターへ移動する際の、クラスター中心に関しての総分散における分別の改善  $f$  を計算する;

【0387】

【数6】

$$f = 1 - ED_k^{(1)} / ED_k^{(2)}$$

式中、 $D_k$  は、帰属するクラスターの中心に関しての構成要素  $k$  の距離基準 (平均) の二乗である。上付の 1 または 2 は、それが全分枝の中心に関するものであるのか、または 2 つのサブクラスターのうちの好適なクラスターの中心に関するものであるのかを示す。このクラスター化法において使用する距離関数  $D$  の定義には、かなりの自由度がある。これらの例においては、 $D = 1 - r$  であり、 $r$  は、実験セットを横断する 1 つの構成要素の応答間の、別の応答に対しての (または平均クラスター応答に対しての) 相関係数である。

【0388】

詳細には、好ましくは客観的統計学的検定を用いてあらゆるクラスター化法またはアルゴリズムのグループ化決定の統計学的信頼性を判定することができる。好ましくは、同様の検定を、階層的および非階層的クラスター化法の双方に用いることができる。クラスターのコンパクト性は、例えば、「クラスターの平均値」からのクラスターのエレメントの距離の二乗の平均として、またより好ましくは、クラスターの平均値からのエレメントの距離の二乗の平均値の逆数として、定量的に定義される。特定のクラスターのクラスター平均値は、一般に、クラスターの全てのエレメントの応答ベクトルの平均値として定義される。しかし、特定の実施形態 (クラスターの平均値に定義が疑わしい場合など) では、例えば、正規化または加重内積の絶対値を用いて、クラスター化アルゴリズムの距離関数 (即ち、 $I = 1 - |r|$ ) を評価する。通常、上記の平均値の定義は、応答ベクトルが反対方向を向き、上記に定義するクラスター平均値がゼロになりうる実施形態では問題を包含し得る。従って、このような実施形態では、クラスターのコンパクト性の異なる定義を選択することが好ましく、例えば限定はしないが、クラスター内のエレメントの全てのペア間の距離の二乗の平均値などがある。あるいは、クラスターのコンパクト性は、クラスターの各エレメント (例えば、細胞構成要素) からそのクラスターの他のエレメントまでの平均距離 (またはより好ましくは、平均距離の逆数) を意味すると定義することができる。

【0389】

本発明において用いられる統計的方法においても使用しうるその他の定義は、当業者には明らかである。

【0390】

別の実施形態では、本発明のプロファイルは、信号処理技術を用いて解析することができる。そのような信号処理技術では、相関関数を定義し、相関係数を計算し、自己相関関数および相互相関関数を定義し、これらについて、重み付けの総和が 1 になるように計算することによって、移動平均を求めることができる。

【0391】

信号処理において、時間領域および周波数領域を考慮することが重要であり得る。自然現象、特に生命および生体の動特性解析において、リズムは重要であることが多い。ここで、ある時間関数  $f(t)$  を考えると、次の条件を満たす関数を周期関数という。

【0392】

$$f(t) = f(t + T)$$

ここで、時間軸上の基準となる点、例えば、時間 0 の点を基準に考えると、このときの関数の値は  $f(0)$  であり、その後種々の変動を繰り返した後時刻  $T$  の時点で  $f(0)$  と同じ値に戻るようになる。このような関数を周期関数と呼び、このような関数としては、例えば、正弦様波が代表例として挙げられる。ここで、 $T$  を周期と呼ぶ。ここで、 $T$  時間に

1回のサイクルを有することをこれは意味するが、単位時間当たりのサイクル数に置き換えて  $1/T$  (サイクル/時間) と表現してもその情報は失われない。このように単位時間当たりのサイクル数で表現される概念は周波数と呼ばれる。ここで周波数を  $f$  としあわすと、

$$f = 1/T$$

で表現できる。ここで、時間と周波数とは表裏の関係であり、時間を扱う場合を時間領域を扱うといい、周波数を扱う場合を周波数領域を扱うという。ここでは、電気工学的に周波数を表現することもできる。例えば、周期は、1周期を角度に直して、 $360^\circ$  または  $2\pi$  ラジアンとして表現することが可能である。このように表現する場合、 $f$  (サイクル/秒) は  $2\pi$  (ラジアン/秒) となり、これを一般に  $\omega$  ( $=2\pi f$ ) とあらわして、角周波数を呼ぶ。

#### 【0393】

ここで、正弦波と余弦波とを比較すると、余弦波は正弦波に比べて  $90^\circ$  または  $\pi/2$  ラジアン平行移動させたものになる。ここで、正弦波は余弦波の時間遅れとしてあらわすことができ、この時間の遅れを位相 (phase) という。例えば、純粋な余弦波において位相を0とすると、正弦波では位相は  $90^\circ$  となる。例えば、正弦波と余弦波とを足したものは、振幅が  $\sqrt{2}$  増え、位相が  $\pi/4$  となる。

#### 【0394】

このような解析において、フーリエ級数および周波数解析の手法が利用され得る。また、フーリエ変換、離散フーリエ変換およびパワースペクトルを利用することも可能である。フーリエ級数展開において、ウェーブレット変換の方法などが利用され得る。このような手法は、当該分野において周知であり、生命システム解析のための数学、コロナ社、清水和幸 (1999)、臨床医学のためのウェーブレット解析、医学出版、石川康宏に記載されている。

#### 【0395】

(好ましい実施形態の説明)

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。

#### 【0396】

1つの局面において、本発明は、細胞の状態を提示する方法を提供する。このような方法は、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る工程；およびb) 上記プロファイルを提示する工程；を包含する。ここでは、例えば、モニターした結果得られる信号強度のプロファイルを区間微分することにより、変化の関数を得、表示することができる。この場合、好ましくは、例えば、構成的プロモーターなどの変化しないと仮定される生物学的因子を基準に差分を取ることによってそのようなプロファイルを得ることができるがそれに限定されない。

#### 【0397】

プロファイルの表示には、どのような方法を用いてもよい。例えば、ディスプレイを用いて視覚的に表示してもよく (例えば、x軸に時間、y軸に信号強度)、あるいは、表計算ソフトウェアなどを利用して、数値表として表示してもよい。あるいは、信号強度をある別の光強度としてディスプレイに表示することも可能である。あるいは、プロファイルは、音声によって表示してもよい。

#### 【0398】

好ましくは、細胞は、支持体 (好ましくは、固相支持体、例えば、アレイ、プレート、マイクロタイタープレートなど) に固定された状態でモニターされる。そのような固定方法は、当該分野において公知の任意の方法または本明細書において記載される方法に基づいて行うことができる。細胞を固定することによって、検査を系統立てて行うことができる。

#### 【0399】

好ましい実施形態において、このようなプロファイルは、リアルタイムで提示され得る。ここで、リアルタイムは、実質的に同時に表示することができる限り、ある程度のタイムラグが生じてよい。許容されるタイムラグは、求められるリアルタイムの同時性によるが、例えば、最大で10秒であり、より好ましくは最大で1秒であり得る。

#### 【0400】

別の局面において、本発明は、細胞の状態を判定する方法を提供する。このような細胞の状態の判定は、転写制御因子の転写状態の変化をプロセスとして観察することから、従来においてはまったく観察されていなかった要素を判断要因に加えることになる。従って、本発明の細胞状態の判定方法は、従来観察することができなかった種々の状態を判定することを可能にする。このような方法は、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る工程；およびb) 上記転写状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する工程を包含する。

#### 【0401】

好ましくは、細胞は、支持体（好ましくは、固相支持体、例えば、アレイ、プレート、マイクロタイタープレートなど）に固定された状態でモニターされる。そのような固定方法は、当該分野において公知の方法または本明細書において記載される方法に基づいて行うことができる。

#### 【0402】

好ましい実施形態において、本発明の細胞状態判定方法では、プロファイルと細胞の状態とを予め相関付ける工程をさらに包含することが有利であり得る。あるいは、そのような相関付けの情報があらかじめ提供されてもよい。そのような相関付けの工程は、判定を行うごとに行ってもよく、データベースとして保存したものを用いてもよい。

#### 【0403】

好ましい実施形態では、使用される生物学的因子は、転写制御配列であってもよく、このような転写制御配列は、例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、他のゲノム構造中構造遺伝子のフランキング配列およびエキソン以外のゲノム配列などであり得るがそれらに限定されない。プロモーターが好ましい。転写状態を直接測定することができるからであり、転写状態は、しばしば、細胞の状態を如実に反映するからである。特定の実施形態では、転写制御配列群は、構成的プロモーター、特異的プロモーターおよび誘導性プロモーターなどであり得る。

#### 【0404】

1つの実施形態において、本発明の生物学的因子（例えば、プロモーター）は、どのようなものでもよく、むしろ、種類を選ばないことが特徴である。本発明の方法を用いることにより、プロファイルを「プロセス」という視点で解析することが可能となったことから、任意の生物学的因子（例えば、プロモーター、構造遺伝子など）またはその異種または同種のセットを用いて細胞の状態を判定することが可能になった。そのような判定は、従来の技術では不可能であったことであり、本発明は、従来技術からは達成不可能であったことを達成したという意味でその有用性は高い。

#### 【0405】

好ましい実施形態では、モニターされる生物学的因子（例えば、転写制御配列）は、少なくとも2つ使用される。少なくとも2つの生物学的因子を観察することによって、通常80%以上（好ましい場合は90%以上、場合によってはほぼ100%）の細胞状態の同定が可能になるからである。より好ましくは、モニターされる生物学的因子は、少なくとも3つの生物学的因子を含む。少なくとも3つの生物学的因子を観察することによって、通常90%以上（好ましい場合は95%以上、場合によってはほぼ100%）の生物学的因子を同定することが可能となるからである。最も好ましい実施形態において、モニターされる生物学的因子は、少なくとも8つの転写制御配列を含む。少なくとも8つの生物学的因子を観察することによって、通常、すべての細胞状態を同定することが可能となるからである。このように、任意の生物学的因子を選択したにもかかわらず、上述のような少

ない数のみを選択し、それをモニターすることによって、ほぼすべての細胞の状態を判定することができることは、予想されていなかったことであり、これは、時間点ごとに観察し、それをヘテロな集団として統計処理をした従来の判定方法に比較して、はるかに簡便で精密で正確な判定を提供することになる。

#### 【0406】

従って、本発明の判定方法では、モニターする前に、生物学的因子群から、少なくとも1つの生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含することが好ましい。本発明の1つの重要な特徴は、生物学的因子として、点ごとの調査では特異性を示していないものでも使用可能であるという点にあるからである。また、本発明では、同一環境において線形的に測定されたデータを利用することから、得られるデータが対象となる細胞の状態をより正確に反映することになる。このような精度のデータは、従来技術では取得不可能であったものである。

#### 【0407】

好ましい実施形態において、本発明において得られるプロファイルは、リアルタイムで提示され得る。あるいは、本発明において、データはリアルタイムで得られ得る。本明細書でいう「リアルタイム」は、実質的に同時に表示することができる限り、ある程度のタイムラグが生じてよいことを意味する。許容されるタイムラグは、求められるリアルタイムの同時性によるが、例えば、最大で10秒であり、より好ましくは最大で1秒であり得る。例えば、リアルタイムの診断が必要な治療などでは、そのリアルタイム性は、例えば、最大で30秒であってもよく、それより長い時間であってもよい。

#### 【0408】

好ましい特定の実施形態において、本発明の細胞の状態判定方法で判定される状態としては、例えば、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期および増殖状態などが挙げられる。より詳細には、そのような状態としては、例えば、がん細胞の抗がん剤に対する応答、薬剤耐性、生物時間に対する応答、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞、神経幹細胞など）の分化状態、あるいは精製した幹細胞（例えば胚性幹細胞）の未分化状態、細胞形態の変化、細胞の移動状態、分子の細胞内局在化、分泌物質産生能力などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0409】

好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞としては、幹細胞または体細胞あるいはそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、そのような細胞は、付着細胞、浮遊細胞、組織形成細胞およびそれらの混合物であってもよい。

#### 【0410】

1つの特定の好ましい実施形態では、本発明の細胞状態判定方法は、支持体（好ましくは固体支持体）として基板上に固定された細胞を対象として行うことができる。そのような場合、固相支持体はチップと呼ばれ、細胞が整列して配置される場合はアレイとも呼ばれる。

#### 【0411】

特に好ましい実施形態において、本発明の細胞状態判定方法では、判定に供される生物学的因子（例えば、転写制御配列）が核酸分子である場合、その核酸分子と作動可能に連結されるレポーター遺伝子配列を含む核酸分子という形態で対象となる細胞にトランスフェクトされることが有利である。このような形態を採用することによって、転写状態がレポーター遺伝子の信号として測定することが可能となるからである。

#### 【0412】

このようなトランスフェクトは、固相上または液相中で行われ得る。ここで、トランスフェクトのために、標的物質の細胞への導入効率を上昇させるための方法が利用され得る。本発明は、通常の条件下では、ほとんど細胞に導入されない標的物質（例えば、DNA、RNA、ポリペプチド、糖鎖またはそれらの複合物質など）を、フィブロネクチンのようなアクチン作用物質とともに細胞に提示する（好ましくは、接触させる）ことによって、その標的物質が効率よく細胞に導入されるという作用を利用する。従って、このトラン

スフェクション方法は、A) 標的物質（すなわち、転写制御配列を含むDNA）を提供する工程；B) アクチン作用物質（例えば、フィブロネクチン）を提供する工程を順不同に包含し、C) 該標的物質および該アクチン作用物質を該細胞に接触させる工程をさらに包含する。ここで、標的物質およびアクチン作用物質は、一緒に提供されてもよく、別々に提供されてもよい。アクチン作用物質としては、上述の本発明の標的物質の細胞内への導入の効率を上昇させるための組成物において詳述した形態が適用され得る。そのような形態は、当業者は、本明細書の記載に基づけば、適切な形態を選択し実施することができる。したがって、このようなアクチン作用物質としては、本発明の標的物質の細胞への導入効率を上昇させるための組成物において適用される形態を当業者が任意に選択して本発明を実施することができる。好ましくは、アクチン作用物質は、細胞外マトリクスタンパク質（例えば、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンなど）またはその改変体であり得る。より好ましくは、フィブロネクチンまたはその改変体もしくはそのフラグメントが使用され得る。

#### 【0413】

1つの実施形態において、本発明において使用される生物学的因子が転写制御配列である場合、その配列は転写因子に結合する能力を有する。そのような転写因子としては、例えば、ISRE、RARE、STAT3、GAS、NFAT、MIC、AP1、SRE、GRE、CRE、NF $\kappa$ B、ERE、TRE、E2F、Rb、p53などが挙げられるがそれらに限定されない。このような転写因子は、セットとしてBD Biosciences Clontech, CA, USA から市販されているものを利用することができる。ここで、ISREは、STAT1/2と関連し、RAREはレチノイン酸と関連する。STAT3は分化制御に関連し、GREは糖代謝に関連する。CREは、cAMPに関連し、TREは甲状腺ホルモンに関連する。E2Fは細胞周期に関連し、p53はG1チェックポイントに関連する。従って、このような情報を元に、細胞状態を判定することが可能である。

#### 【0414】

好ましい実施形態において、本発明における判定工程は、本発明で得られたプロファイルの位相を比較することを包含する。位相の算出は、本明細書において上述される一般方法、および実施例に記載される方法を参酌して、当業者が適宜行うことができる。

#### 【0415】

別の好ましい実施形態において、本発明における判定工程は、上記細胞のプロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する。差分の算出は、本明細書において上述される一般方法、および実施例に記載される方法を参酌して、当業者が適宜行うことができる。

#### 【0416】

別の好ましい実施形態において、本発明における判定工程は、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理を包含する。このような数学処理は、当業者には周知であり、本明細書の記載を参酌して、容易に実施することができる。

#### 【0417】

別の局面において、本発明は、外来因子と、外来因子に対する細胞の応答とを相関付ける方法を提供する。この方法では、a) 上記細胞を外来因子に曝露する工程；b) 上記細胞に存在する転写制御因子群から選択される少なくとも1つの転写制御因子に関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る工程；およびc) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける工程が包含される。

#### 【0418】

本発明において相関付けがされる外来因子はどのようなものでもよい。そのような外来因子は、細胞に直接または間接的に適用可能であるものが好ましい。外来因子の曝露方法は当該分野において周知であり、その外来因子の種類などによって変動する。物質であれば、その物質を溶媒中に溶解し、その溶液を細胞を含む培地中に滴下することによって曝露が達成される。



**【0419】**

本発明の相関付けの方法でもまた、プロファイルの生成は、上述のように行うことができる。

**【0420】**

本発明の相関付けの方法における、外来因子と、プロファイルとの相関付けは、種々の方法を提供して行うことができる。簡便には、ある外来因子が滴下された場合のプロファイルをパターン化し、そのプロファイルからの相違が少ない場合には、その外来因子が滴下されたと推定することができる。

**【0421】**

好ましくは、細胞は、固相支持体（例えば、アレイ、プレート、マイクロタイタープレートなど）に固定された状態でモニターされる。そのような固定方法は、当該分野において公知の方法または本明細書において記載される方法に基づいて行うことができる。

**【0422】**

好ましい実施形態において、本発明の相関付け方法では、少なくとも2つの外来因子を使用して、各外来因子に対するプロファイルを得る工程を包含してもよい。このような外来因子は、ある実施形態では、少なくとも3つ、あるいは4つ、より好ましくは、少なくとも10個用いられ得るがそれらに限定されない。

**【0423】**

特定の実施形態において、本発明の相関付けの方法は、少なくとも2つのプロファイルを類別することにより、該プロファイルに対応する外来因子を類別する工程を包含する。このような類別は、当業者は、本明細書の記載を参酌すれば、容易に行うことができる。このような類別により、本発明の方法を用いて、未知の外来因子の相関付けおよび同定を達成することができる。

**【0424】**

好ましい実施形態では、生物学的因子として転写制御配列が使用される場合は、そのような配列は、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、他のゲノム構造中構造遺伝子のフランキング配列およびエキソン以外のゲノム配列などであり得るがそれらに限定されない。プロモーターが好ましい。転写状態を直接測定することができるからである。

**【0425】**

特定の実施形態では、転写制御配列群は、構成的プロモーター、特異的プロモーターおよび誘導性プロモーターなどであり得る。ここで、プロモーターは、どのようなものでもよく、むしろ、種類を選ばないことが特徴である。本発明の方法を用いることにより、プロファイルを「プロセス」という視点で解析することが可能となったことから、任意のプロモーターまたはそのセットを用いて細胞の状態を判定することが可能になった。そのような判定は、従来技術では不可能であったことであり、本発明は、従来技術からは達成不可能であったことを達成したという意味でその有用性は高い。

**【0426】**

好ましい実施形態では、モニターされる生物学的因子（例えば、転写制御配列）は、少なくとも2つ使用される。少なくとも2つの生物学的因子を観察することによって、通常80%以上（好ましい場合は90%以上、場合によってはほぼ100%）の細胞状態の同定が可能になるからである。より好ましくは、モニターされる生物学的因子は、少なくとも3つの生物学的因子を含む。少なくとも3つの生物学的因子を観察することによって、通常90%以上（好ましい場合は95%以上、場合によってはほぼ100%）の生物学的因子を同定することが可能となるからである。最も好ましい実施形態において、モニターされる生物学的因子は、少なくとも8つの転写制御配列を含む。少なくとも8つの生物学的因子を観察することによって、通常、すべての細胞状態を同定することが可能となるからである。このように、任意の生物学的因子を選択したにもかかわらず、上述のような少ない数のみを選択し、それをモニターすることによって、ほぼすべての細胞の状態を判定することができることは、予想されていなかったことであり、これは、時間点ごとに観察し、それをヘテロな集団として統計処理をした従来の判定方法に比較して、はるかに簡便

で精密で正確な判定を提供することになる。

【0427】

従って、本発明の判定方法では、モニターする前に、生物学的因子群から、少なくとも1つの生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含することが好ましい。本発明の1つの重要な特徴は、生物学的因子として、点ごとの調査では特異性を示していないものでも使用可能であるという点にあるからである。

【0428】

好ましい実施形態において、このようなプロファイルは、リアルタイムで提示され得る。ここで、リアルタイムは、実質的に同時に表示することができる限り、ある程度のタイムラグが生じてよい。許容されるタイムラグは、求められるリアルタイムの同時性によるが、例えば、最大で10秒であり、より好ましくは最大で1秒であり得る。例えば、リアルタイムの外来因子の同定が必要な環境測定などでは、そのリアルタイム性は、例えば、最大で1秒または最大で0.1秒などであってもよい。あるいは、データがリアルタイムで記録媒体に格納された後、格納されたデータに基づいてタイムラグをもってそのデータに対応するプロファイルが提示されてもよい。

【0429】

本発明の相関付けの好ましい実施形態において、工程c)では、外来因子との相関付けに使用される上記プロファイルの情報として、該プロファイルの位相が用いられる。位相は、ある周期における信号強度がプラスおよびマイナスの二種類で表示され、そのように単純化された方法を用いても、細胞を同定あるいは外来因子を同定することができることから、本発明の方法の精密性が実証される。

【0430】

好ましくは、本発明の方法では、細胞は、アレイ上で培養されることが有利である。アレイ上で培養することによって、多数の細胞の観察を一度に行うことができるからである。好ましくは、アレイのような固体支持体上で細胞が固定されるときは、塩が使用される。

【0431】

好ましい実施形態において、細胞の状態の経時的モニターは、上記アレイから画像データを得る工程を包含する。画像データを提供することによって、目視も可能になり、人間（特に、医師などの当業者）の目による判断を得ることが容易になるからである。

【0432】

本発明の好ましい実施形態において、外来因子とプロファイルとを相関付けの工程は、プロファイルの位相の異同を識別することを包含する。位相は上述したように、簡便なパラメータであり、その情報処理が簡便であるからであり、その簡便な情報処理によるのみで、細胞を十分に同定することが可能である。

【0433】

好ましい実施形態において、本発明の方法において同定されるべき外来因子としては、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧などが挙げられるがそれらに限定されない。このような因子は、従来の方法では、十分に同定することができなかったが、プロセスを重視した本発明の細胞判定方法を用いることによって、十分に因子の細胞に対する影響を調査することが可能になった。

【0434】

特に好ましい実施形態では、本発明の方法において同定されるべき外来因子は化学物質であり、そのような化学物質としては、生体分子、化学合成物または培地などが挙げられる。

【0435】

このような生体分子としては、例えば、核酸、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンなどが挙げられるがそれらに限定されない。このような生体分子は、生物に対して影響を与えることが公知であるか、

未知であってもその可能性が十分に高いことから、調査対象として重要なものであると考えられる。

#### 【0436】

特に好ましくは、細胞に影響を与えることが期待される、ホルモン、サイトカイン、細胞接着因子、細胞外マトリクス、レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストなどが調査されるべき生体分子として利用される。

#### 【0437】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための方法を提供する。本発明の方法は、a) 上記細胞を複数の既知の外来因子に曝露する工程；b) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得る工程；c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける工程；d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；e) 上記選択された生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る工程；f) 上記工程（b）で得られたプロファイルの中から、上記工程（e）で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；およびg) 上記未同定の外来因子は、上記工程（f）において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する工程；を包含する。

#### 【0438】

この方法において、外来因子の曝露は、本明細書において上述し、実施例において例示するように行うことができる。プロファイルの生成もまた、本明細書において上述し、実施例において例示するように行うことができる。相関付けもまた、本明細書において上述し、実施例において例示するように行うことができる。このようにして、既知の外来遺伝子に関する情報がそろったところに、未同定の外来因子について同様のモニターを行い、それらを比較して、その未同定の外来因子が既知のものであるかどうかを判定することが可能である。この場合、プロファイルがまったく同じであれば、当然に同じであると判断することが可能であるが、実質的に同じである場合もまた、既知外来因子と判定することが可能である。そのような判定は、その既知の外来因子に関する情報の量および質に依存する。そのような判定の判断は、当業者には容易であり、種々の要素を考慮して決定することができる。

#### 【0439】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための方法を提供する。このような方法は、a) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関して、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する工程；b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；c) 上記選択された生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る工程；d) 上記工程（a）において提供された、上記プロファイルの中から、上記工程（c）において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；およびe) 上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する工程を包含する。

#### 【0440】

ここで、外来遺伝子の曝露、プロファイル生成、相関付けなどは、本明細書において上述し、実施例において例示するような技術を利用することができる。

#### 【0441】

別の局面において、本発明は、細胞の状態を提示するためのシステムを提供する。このようなシステムは、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手段；およびb) 上記プロファイルを提示する手段を備える。システム構成例は、図

32に示される。

【0442】

本発明の細胞状態提示方法を実行するコンピュータ構成あるいはそれを実現するシステムの例を図17を参照して示す。図17は、本発明の細胞状態提示方法を実行するコンピュータの500の構成例を示す。システム構成例は、図32に示される。

【0443】

コンピュータ500は、入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504と、バス505とを備える。入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504とは、バス505によって相互に接続されている。入力部501と出力部503とは入出力装置506に接続されている。

【0444】

コンピュータ500によって実行される細胞状態提示の処理の概略を説明する。

【0445】

細胞状態提示方法を実行させるプログラム（以下、細胞状態提示プログラムという）は、例えば、メモリ502に格納されている。あるいは、細胞状態提示プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROMのような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケーションサーバに格納されていてもよい。そのような記録媒体に記録された細胞状態提示プログラムは、入出力装置506（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ500のメモリ504にロードされる。CPU502が細胞状態提示プログラムを実行することによって、コンピュータ500は、本発明の細胞状態提示方法の処理を実行する装置として機能する。

【0446】

入力部501を介して、細胞に関する情報などを入力する。また、測定されたプロフィールのデータも入力される。必要に応じて、既知の情報に関する情報も入力してもよい。

【0447】

CPU502は、入力部501で入力された情報をもとに、プロフィールデータおよび細胞の情報から表示データを生成し、メモリ504に表示データを格納する。その後、CPU502は、これらの情報をメモリ504に格納し得る。その後、出力部503は、CPU502が選択した細胞の状態を表示データとして出力する。出力されたデータは、入出力装置506から出力され得る。

【0448】

別の局面において、本発明は、細胞の状態を判定するシステムを提供する。このようなシステムは、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手段；およびb) 上記転写状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する手段、を備える。システム構成例は、図32に示される。

【0449】

本発明の細胞状態判定方法を実行するコンピュータ構成あるいはそれを実現するシステムの例を図17を参照して示す。図17は、本発明の細胞状態判定方法を実行するコンピュータの500の構成例を示す。システム構成例は、図32に示される。

【0450】

コンピュータ500は、入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504と、バス505とを備える。入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504とは、バス505によって相互に接続されている。入力部501と出力部503とは入出力装置506に接続されている。

【0451】

コンピュータ500によって実行される細胞状態判定の処理の概略を説明する。

【0452】

細胞状態判定方法を実行させるプログラム（以下、細胞状態判定プログラムという）は

、例えば、メモリ502に格納されている。あるいは、細胞状態判定プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROMのような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケーションサーバに格納されていてもよい。そのような記録媒体に記録された細胞状態判定プログラムは、入出力装置506（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ500のメモリ504にロードされる。CPU502が細胞状態判定プログラムを実行することによって、コンピュータ500は、本発明の細胞状態判定方法の処理を実行する装置として機能する。

#### 【0453】

入力部501を介して、細胞に関する情報などを入力する。また、測定されたプロファイルのデータも入力される。必要に応じて、既知の情報に関する情報も入力してもよい。

#### 【0454】

CPU502は、入力部501で入力された情報をもとに、プロファイルデータおよび細胞の情報から細胞の状態を判定し、その結果を判定結果データとして生成し、メモリ504に判定結果データを格納する。その後、CPU502は、これらの情報をメモリ504に格納し得る。その後、出力部503は、CPU502が選択した細胞の状態を判定結果データとして出力する。出力されたデータは、入出力装置506から出力され得る。

#### 【0455】

別の局面において、本発明は、外来因子と、外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるためのシステムを提供する。このシステムは、a) 上記細胞を外来因子に曝露する手段；b) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手段；およびc) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける手段を備える。このようなシステムもまた、上述のシステムと同様にコンピュータを用いて実現することができる。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0456】

他の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するためのシステムを提供する。このようなシステムは、a) 上記細胞を複数の既知の外来因子に曝露する手段；b) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得る手段；c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける手段；d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；e) 上記選択されたプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る手段；f) 上記手段(b)で得られたプロファイルの中から、上記手段(e)で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決める手段；およびg) 上記未同定の外来因子は、上記手段(f)において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手段を備える。このようなシステムもまた、上述のシステムと同様にコンピュータを用いて実現することができる。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0457】

他の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するためのシステムを提供する。このようなシステムは、a) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関して、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する手段；b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；c) 上記選択された生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手段；d) 上記手段(a)において提供された、上記プロファイルの中から、上記手段(c)において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決める手段；およびe) 上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手段を備える。このようなシステムもまた、上述のシステ

ムと同様にコンピュータを用いて実現することができる。システム構成例は、図32に示される。

【0458】

本発明が上述のようにシステム形態として提供される場合、各々の構成要件は、本発明が方法として提供されるのと同様の詳細なまたは好ましい実施形態を適用して実施することが可能であり、そのような好ましい実施形態の選択は、当業者には容易であり、当業者は、このようなシステムの好ましい実施形態を、本明細書の記載を参酌して容易に行うことができる。システム構成例は、図32に示される。

【0459】

別の局面において、本発明は、コンピュータに細胞の状態を提示する処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。ここで、この記録媒体には、少なくとも、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手順；およびb) 上記プロファイルを提示する手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

【0460】

別の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞の状態を判定する処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。このような記録媒体には、少なくともa) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手順；およびb) 上記転写状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

【0461】

別の局面において、本発明は、コンピュータに、外来因子と、外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるための処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。この記録媒体には、少なくともa) 上記細胞を外来因子に曝露する手順；b) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手順；およびc) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

【0462】

他の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。この記録媒体には、少なくともa) 上記細胞を複数の既知の外来因子に曝露する手順；b) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得る手順；c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける手順；d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手順；e) 上記選択されたプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る手順；f) 上記手順(b)で得られたプロファイルの中から、上記手順(e)で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手順；およびg) 上記未同定の外来因子は、上記手順(f)において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

【0463】

他の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。この記録媒体には、少なくともa) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関して、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関



係に関するデータを提供する手順；b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手順；c) 上記選択されたプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手順；d) 上記手順（a）において提供された、上記プロファイルの中から、上記手順（c）において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決断する手順；およびe) 上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

#### 【0464】

本発明が上述のように記録媒体形態として提供される場合、各々の構成要件は、本発明が方法として提供されるのと同様の詳細なまたは好ましい実施形態を適用して実施することが可能であり、そのような好ましい実施形態の選択は、当業者には容易であり、当業者は、このような記録媒体の好ましい実施形態を、本明細書の記載を参酌して容易に行うことができる。

#### 【0465】

別の局面において、本発明は、コンピュータに細胞の状態を提示する処理を実行させるためのプログラムを提供する。ここで、このプログラムは、少なくともa) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手順；およびb) 上記プロファイルを提示する手順、を実行させる。

#### 【0466】

別の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞の状態を判定する処理を実行させるためのプログラムを提供する。ここで、このプログラムは、少なくともa) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手順；およびb) 上記転写状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する手順、を実行させる。

#### 【0467】

別の局面において、本発明は、コンピュータに、外来因子と、外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるための処理を実行させるためのプログラムを提供する。このプログラムは、少なくともa) 上記細胞を外来因子に曝露する手順；b) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手順；およびc) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける手順、を実行させる。このような手順を実行させるための技術は、当該分野において周知であり、その目的に応じて適切なプログラムを当業者は作成することができる。

#### 【0468】

他の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための処理を実行させるためのプログラムを提供する。このプログラムは、少なくともa) 上記細胞を複数の既知の外来因子に曝露する手順；b) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得る手順；c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける手順；d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手順；e) 上記選択されたプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る手順；f) 上記手順（b）で得られたプロファイルの中から、上記手順（e）で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決断する手順；およびg) 上記未同定の外来因子は、上記手順（f）において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手順、を実行させる。

#### 【0469】

他の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための処理を実行させるためのプログラムを提供する



。このプログラムは、少なくとも a) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関して、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する手順； b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手順； c) 上記選択されたプロモーターに関連する細胞の状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手順； d) 上記手順 (a) において提供された、上記プロファイルの中から、上記手順 (c) において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決断する手順；および e) 上記未同定の外来因子は、上記決断されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決断する手順、を実行させる。

#### 【0470】

本発明が上述のようにプログラム形態として提供される場合、各々の構成要件は、本発明が方法として提供されるのと同様の詳細なまたは好ましい実施形態を適用して実施することが可能であり、そのような好ましい実施形態の選択は、当業者には容易であり、当業者は、このようなプログラムの好ましい実施形態を、本明細書の記載を参酌して容易に行うことができる。そのようなプログラムの記述形式は、当業者には周知であり、例えば、C+言語などを応用することができる。

#### 【0471】

別の局面において、本発明は、被検体を診断する方法およびシステムを提供する。この診断方法は、a) 上記被検体の細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る工程； b) 上記状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する工程；および c) 上記細胞の状態から上記被検体の状態、障害または疾患を判定する工程、を包含する。この診断方法がシステムとして提供される場合、本発明のシステムは、a) 上記被検体の細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手段； b) 上記細胞の状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する手段；および c) 上記細胞の状態から上記被検体の状態、障害または疾患を判定する手段、を備える。このように、本発明は、細胞の種々の状態、生存、分化、薬剤耐性、適切な抗がん剤の選択、適切な移植細胞の選択などのテーラーメイド診断および治療に応用可能である。好ましくは、本発明の診断方法は、診断結果に応じて選択した治療または予防を被検体に施す工程を包含する治療または予防方法として提供される。別の好ましい実施形態では、本発明の診断システムは、診断結果に応じて選択した治療または予防を提供する手段を備える、治療または予防システムとして提供される。システム構成例は、図 32 に示される。

#### 【0472】

本発明の診断方法または治療方法を実行するコンピュータ構成あるいはそれを実現するシステムの例を図 17 を参照して示す。図 17 は、本発明の診断方法を実行するコンピュータの 500 の構成例を示す。システム構成例は、図 32 に示される。

#### 【0473】

コンピュータ 500 は、入力部 501 と、CPU 502 と、出力部 503 と、メモリ 504 と、バス 505 とを備える。入力部 501 と、CPU 502 と、出力部 503 と、メモリ 504 とは、バス 505 によって相互に接続されている。入力部 501 と出力部 503 とは入出力装置 506 に接続されている。

#### 【0474】

コンピュータ 500 によって実行される関連付けの処理の概略を説明する。

#### 【0475】

関連付け方法および／または処置もしくは予防の選択を実行させるプログラム（以下、それぞれ関連付けプログラムおよび選択プログラムという）は、例えば、メモリ 502 に格納されている。あるいは、関連付けプログラムおよび選択プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROM のような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケ

ーションサーバに格納されていてもよい。そのような記録媒体に記録された関連付けプログラムおよび／または選択プログラムは、入出力装置 506（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ 500 のメモリ 504 にロードされる。CPU 502 が関連付けプログラムおよび／または選択プログラムを実行することによって、コンピュータ 500 は、本発明の関連付け方法および／または選択方法の処理を実行する装置として機能する。

#### 【0476】

入力部 501 を介して、プロファイルの分析の結果（例えば、位相など）および細胞の状態に関する情報などを入力する。必要に応じて、プロファイルと関連付けられる状態、障害または疾患などの副次的情報、処置および／または予防に関する情報も入力してもよい。

#### 【0477】

CPU 502 は、入力部 501 で入力された情報をもとに、プロファイルに関する情報と細胞の状態または被検体の状態、障害または疾患に関する情報、および必要に応じて予防または治療方法とを関連付け、メモリ 504 に関連データを格納する。その後、CPU 502 は、これらの情報をメモリ 504 に格納し得る。その後、出力部 503 は、CPU 502 が選択した細胞の状態に関する情報、被検体の状態、障害または疾患に関する情報、および必要に応じて予防または治療方法などを診断情報として出力する。出力されたデータは、入出力装置 506 から出力され得る。

#### 【0478】

（データ生成）

1つの局面において、本発明は、細胞の情報に関するプロファイルデータを生成する方法を提供する。この方法は、a) 細胞を支持体上に固定して配置する工程；および b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；を包含する。この局面の本発明の重要な特徴のひとつは、細胞に関して継続して（例えば、経時的に）同一の情報が得られるように、細胞を実質的に支持体上の同一の箇所に固定することができるようになった点にある。これにより、細胞の生物学的因子およびその集合体の経時的モニターが可能となった。経時的モニターが可能となったことにより、細胞のプロファイルを得ることができ、デジタル細胞を構築することが可能となった。細胞を支持体に固定するために、本発明は、支持体において、例えば、塩のような固定化剤が使用され得る。塩と、正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、細胞との組み合わせで支持体に細胞が固定され得る。そのような塩としてはどのようなものでも使用することができ、例えば、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンなどが利用され得るがそれらに限定されない。そのような正に荷電した物質と負に荷電した物質との組み合わせとしては、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体からなる群より選択される負に荷電した物質と、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸及びその複合体からなる群より選択される正に荷電した物質との複合体が挙げられるがそれらに限定されない。本発明において、好ましい実施形態では、対象となる生物学的因子が核酸分子または該核酸分子に由来する分子であり得る。核酸分子は、遺伝情報を司ることが多く、そのような遺伝情報に関し、細胞の情報を得ることができるからである。

#### 【0479】

別の局面において、本発明は、a) 細胞を支持体上に固定して配置する工程；および b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；を包含する方法によって得られるデータに関する。このようなデータは、従来なかった方法によって得られるデータであり、それ自体新規のものである。従って、本発明は、このようなデータを含む記録媒体を提供する。

#### 【0480】

別の局面において、本発明は、複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロフィールデータを生成する方法に関する。この方法は、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；およびb) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程を包含する。この局面の本発明の重要な特徴のひとつは、同一環境にある複数の細胞の情報に関するプロフィールデータを得ることができた点にある。そのような環境を提供する技術もまた、本発明の範囲内にある。同一環境を複数の細胞に提供するために、本発明は、支持体において、例えば、塩のような固定化剤が使用され得る。塩と、正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、細胞との組み合わせで支持体に細胞が固定され得る。そのような塩としてはどのようなものでも使用することができ、例えば、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、H E P E S、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンなどが利用され得るがそれらに限定されない。そのような正に荷電した物質と負に荷電した物質との組み合わせとしては、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体からなる群より選択される負に荷電した物質と、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸及びその複合体からなる群より選択される正に荷電した物質との複合体が挙げられるがそれらに限定されない。本発明において、好ましい実施形態では、対象となる生物学的因子が核酸分子または該核酸分子に由来する分子であり得る。核酸分子は、遺伝情報を司ることが多く、そのような遺伝情報に関し、細胞の情報を得ることができるからである。

#### 【0481】

好ましい実施形態において、本発明の方法では、対象となる細胞には、アクチン作用物質が提供されることが好ましい。アクチン作用物質は、細胞内のアクチンに作用し、細胞の内部骨格を変形させて、外部から外来因子を導入することが容易になるという効果を有する。このようなアクチン作用物質の存在により、目的となる外来因子の細胞内での影響を調べることが可能となる。

#### 【0482】

1つの実施形態において、本発明において対象とされる生物学的因子は、核酸、タンパク質、糖鎖、脂質、低分子、それらの複合分子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む。

#### 【0483】

好ましい実施形態において、本発明では、対象となる細胞は、モニター前に、ある程度の期間刺激なしで培養することが好ましい。対象となる細胞を同期化するためである。同期化に必要な期間としては、例えば、少なくとも1日間、より好ましくは、少なくとも2日間、さらに好ましくは少なくとも3日間、さらにより好ましくは少なくとも5日間培養することが有利であり得る。ただし、培養が長くなるにつれ、培養条件を維持する必要性が高くなる。同期化は、各細胞に供給される培地が同一であることが好ましいことから、培養中の培地は、常に同一であるか、あるいは、少なくとも同様に変化していることが好ましい。したがって、好ましくは、そのために、培地を対流させる手段を備え、使用してもよい。

#### 【0484】

より好ましい実施形態において、本発明において細胞に提供される生物学的因子は、遺伝子をコードする核酸分子を含み得る。遺伝子をコードする核酸分子は、好ましくは、細胞にトランスフェクトされる。好ましくは、トランスフェクション試薬（遺伝子導入試薬）とともにこのような生物学的因子が提供され得る。さらに好ましくは、遺伝子をコードする核酸分子は、遺伝子導入試薬およびアクチン作用物質とともに細胞に提供され得る。このとき、細胞は、塩と、正に荷電した物質と負に荷電した物質と（ここでは、核酸分子と遺伝子導入試薬と）の複合体とともに提供されることが好ましい。このことにより、細胞および対象となる分子が支持体に固定され、かつ、壁のない状態で別々の生物学的因子（例えば、核酸分子）が細胞内に導入されることが可能となった。壁のない状態で細胞を

モニターできることから、実質的に同一の環境下で複数の細胞をモニターすることが可能となる。しかも、異なる生物学的因子を細胞内に導入することもできることから、そのような生物学的因子によって影響を受ける、細胞の状態のプロファイルを取得することができるようになった。このようなプロファイルは、データとして格納することが可能であり、しかも、そのようなデータは、一定の規格でなされたデータであるから、再現および比較が可能となるという点で、従来の生物学的アッセイで得られた結果とは全く異なる効果を有するといえる。しかも、そのような一定の規格で生成されたデータは、一度格納されると、何度でも多種多様な目的で取り出して使用することができることから、例えば、研究者が種々の解析を行うために、全く同一条件で実質的に無限大の条件の違いを考慮して「仮想実験」を行うことも可能となった。その上、一定の仮想実験および結果が、生の状態を反映した形で格納されていることから、従来、ウェットな仕事でその学生生活の大半をすごさざるを得なかった、生物系の大学生および大学院生が、真の意味でのデータ解析教育を受けることも可能になった。また、このようにして得られた細胞プロファイルデータは、規格化することが容易であるので、世界中で同じ条件で実験を行ったと考えてよいデータをもとに研究を行うことが可能となった。そのようなデータは、規格化された形態で流通されてもよい。そのような規格化された形態は、通常のコンピュータ（例えば、Windows（登録商標）、Mac、UNIX（登録商標）、Linuxなどの通常手に入るOSが装備されたもの）によって読み取り可能な形態であり得る。本発明で生成されるデータは、生成された細胞プロファイルデータ、生成の際に使用した実験条件に関する情報、細胞に関する情報、環境に関する情報などを含み得る。

#### 【0485】

好ましい実施形態において、本発明が対象とするプロファイルは、遺伝子発現のプロファイル、アポトーシスシグナルのプロファイル、ストレスシグナルのプロファイル、分子（好ましくは、蛍光、燐光、放射性物質またはその組み合わせにて標識される）の局在化に関するプロファイル、細胞形態の変化、プロモーターのプロファイル、特定薬剤（例えば、抗生物質、リガンド、毒素、栄養素、ビタミン、ホルモン、サイトカインなど）依存性のプロモーターのプロファイル、分子間相互作用のプロファイルなどを含み得る。ここで、本発明の対象が、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含む実施形態において、本発明は、好ましくはこの特定薬剤を投与するさらに工程を含んでいてもよい。

#### 【0486】

好ましい実施形態において、本発明は、外来刺激が細胞に提供される工程をさらに包含してもよい。このような外来刺激は、生物学的因子であってもよく、そうでなくてもよい。外来因子は、任意の因子であり得、例えば、物質または他の要素（例えば、電離線、放射線、光、音波などのエネルギー）が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0487】

1つの実施形態において、本発明において使用される外来因子は、RNAiを含み得る。RNAiは、実質的に任意の遺伝子の抑制を調べることができることから、存在する遺伝子分だけRNAiを作製してその効果を調べることもできる。RNAiは当該分野において周知の方法によって作製することができる。

#### 【0488】

別の実施形態において、本発明において使用される外来因子は、生体に存在しない化学物質を含み得る。このように生体に存在しない化学物質を、細胞に提供することによって、種々の情報を収集することができる。また、一旦収集されたデータは再利用することができることから、生体に存在しない化学物質がほとんど入手不可能な場合であっても、一旦本発明においてデータを取得することができれば、入手可能性を気にすることなく、研究を続けることが可能となる。

#### 【0489】

1つの実施形態において、本発明が対象とし得る外来因子は、細胞のレセプターに対するリガンドを含み得る。リガンドを分析することによって、種々のシグナル伝達経路を調査することが可能である。したがって、このような場合、本発明によって得られるプロフ

ファイルは、レセプターリガンド相互作用のプロファイルを含む。

【0490】

好ましい実施形態において、本発明によって得られるプロファイルは、細胞形態であり、ここで、本発明の方法は、遺伝子の過剰発現、過小発現もしくはノックダウン、外来因子の添加および環境の変化からなる群より選択され得る刺激を細胞に与える工程をさらに含んでいてもよい。

【0491】

より好ましい実施形態において、本発明によって得られるプロファイルは、細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含む。このような分子間の相互作用のプロファイルとしては、例えば、シグナル伝達経路において登場する分子と分子との間の相互作用、レセプターとリガンドとの相互作用、転写因子と転写因子配列との相互作用などのプロファイルが挙げられるがそれらに限定されない。

【0492】

別の好ましい実施形態では、本発明によって得られるプロファイルは、前記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含み、ここで、本発明はツーハイブリッド法、FRETおよびBRETからなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する。ここで、ツーハイブリッド法は、分子間相互作用を細胞内において検出する。詳細に関しては、Protein-Protein Interactions, A MOLECULAR CLONING MANUAL, Edited by Erica Golemis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載されている（この文献は、FRETも記載する）。FRETは、分子間、分子内の共鳴エネルギー移動を蛍光波長の変化として検出するという技術であり、Protein-Protein Interactions、前出、Miyawaki A. Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. Dev Cell. 2003 Mar;4(3):295-305.Reviewに説明されている。BRETは、分子間相互作用アッセイシステムであり、Boute N, The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. Trends Pharmacol Sci. 2002 Aug;23(8):351-4. Reviewに詳述されている。

【0493】

1つの好ましい実施形態において、本発明では、対象となる細胞が、支持体上にアレイ状に配置されていることが好ましい。この場合、好ましくは、本発明において対象となる複数の細胞は、各々が最大10cm、より好ましくは、最大1cm、さらに好ましくは、最大1mmもっとも好ましくは、最大0.1mmの間隔をあけて配置され得る。細胞同士は、最低限の間隔をあけることが必要である。そのような間隔は、相互作用をしない程度に保つことが好ましい。

【0494】

1つの実施形態において、本発明で得られるプロファイルはリアルタイムに得られてもよいが、得られなくてもよい。リアルタイムで得ることが有利であり得る。同時性が重要である場面ではそのようなリアルタイム性は重要である。あるいは、格納することが目的の場合は、必ずしもリアルタイム性は必要ではない。

【0495】

さらなる実施形態において、本発明は、細胞を固相支持体に固定する工程をさらに包含する。ここで、固体支持体への固定は、塩、複合体、アクチン作用物質などとともに行うことが可能であり得る。

【0496】

1つの実施形態において、本発明によって生成されるデータは、プロファイルに関する情報を含む。好ましい実施形態では、本発明によって生成されるデータは、モニターにおける条件に関する情報、細胞の状態に関する情報、外来因子に関する情報、環境に関する情報などをさらに含んでいてもよい。

【0497】

好ましい実施形態において、本発明においてモニターされる生物学的因子は、少なくとも2種の生物学的因子を含み、より好ましくは、少なくとも3種の生物学的因子を含み、

さらに好ましくは、少なくとも 8 種の生物学的因子を含み得る。あるいは、ある特定の生物学的因子であれば、そのカテゴリーすべて（例えば、嗅覚レセプター、味覚レセプターであれば、存在するすべてのレセプター）を含むことがもっとも好ましい実施形態であり得る。

【0498】

あるいは、別の好ましい実施形態では、本発明は、このような生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含してもよい。

【0499】

好ましい実施形態では、本発明が対象とする細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択され得る。

【0500】

1 つの実施形態において、本発明において使用される支持体は、固相支持体であることが好ましい。固定することが容易であるからである。そのような固相支持体は、当該分野において公知の任意の物質を材料として使用することができる。ここで、この支持体は、基盤の形態を採っていてもよい。

【0501】

1 つの実施形態において、本発明では、生物学的因子は核酸であり、この細胞は、該核酸でトランスフェクトされることが有利である。このように核酸でトランスフェクトすることによって、その核酸が細胞に与える影響をリアルタイムであるいは規定化された格納可能な様式でデータとしてプロファイルを集積することが可能となる。このようなことは、従来技術では実現不可能であった。好ましい実施形態では、このトランスフェクトは固相上または液相中で行われ得る。より好ましくは、このトランスフェクトは固相上で行われることが有利である。データ収集および規格化がより容易であるからである。

【0502】

本発明の好ましい実施形態では、プロファイルの処理は、位相の比較、コントロールプロファイルとの差分計算、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される処理により処理され得る。そのように処理されたデータもまた、本発明の範囲内にある。

【0503】

別の局面において、本発明は、複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを提示方法を提供する。この方法は、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；およびc) 該データを提示する工程、を包含する。

【0504】

ここで、複数の細胞を同一環境に保つことができる支持体は、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。データを生成する工程もまた、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。データを提示する工程もまた、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。そのような提示方法としては、例えば、視覚的、聴覚的、嗅覚的、触覚的、味覚的など種々の感覚手段を利用する方法が挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、視覚的な提示手段が利用される。例えば、コンピュータのディスプレイなどが例示され得る。

【0505】

好ましくは、本発明の提示方法では、提示はリアルタイムで行われ得る。あるいは、格納されたデータを呼び出して遅れて提示されてもよい。リアルタイムで提示が行われるべき場合は、データ信号が直接例えばディスプレイに送信され得る。

【0506】

別の局面において、本発明は、同一環境にある細胞の状態を判定する方法を提供する。ここで、この方法は、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；およびc) 該データから該細胞の状



態を判定する工程、を包含する。

【0507】

ここで、複数の細胞を同一環境に保つことができる支持体は、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。データを生成する工程もまた、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。細胞の状態を判定する工程は、例えば、生成されたデータと、細胞に関する情報とを相関付けるか、あるいは、標準的なデータと比較することなどによって判定を行うことができる。この場合、統計学的処理が行われてもよい。

【0508】

したがって、ある実施形態において、本発明は、本発明によって得られるプロファイルと細胞の状態とを予め相関付ける工程をさらに包含する。判定を円滑に行うためには、好ましくは、本発明において対象とする細胞は、状態が既知の細胞を含むことが有利である。状態が既知の細胞に関するデータをすでに保持することが可能であることから、その既知細胞と未知細胞とのデータ比較により、判定を迅速に行うことが可能となるからである。

。

【0509】

判定の際には、好ましくは、対象となる生物学的因子は、少なくとも2種存在することが有利である。そのような生物学的因子が複数存在するとき、生物学的因子は、異種カテゴリー（例えば、タンパク質および核酸など）であってもよく、同種カテゴリーであってもよい。

【0510】

好ましくは、本発明は、生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する。どのような生物学的因子を選択しても、細胞の状態は、ある程度特著付けることができ、場合によっては同定することも可能であることから、本発明は、従来技術からは想像もつかない効果を奏するといえる。

【0511】

ここで、本発明の判定方法では、好ましくは、データは、リアルタイムで生成される。データがリアルタイムで生成されることにより、未知物質または状態が未知の細胞の判定がリアルタイムで行われ得るからである。

【0512】

ここで、本発明の判定方法において、対象とされる細胞の状態としては、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期および増殖状態などが挙げられるが、それらに限定されない。

【0513】

本発明において対象とされる細胞は、幹細胞であっても体細胞であってもよい。体細胞は、どのような細胞であってもよい。細胞の選択は、細胞を使う目的によって当業者が適宜選択することができる。

【0514】

本発明の判定方法で用いられる固相支持体は、基板を含む。基板とすることで、本発明は、コンピュータシステムの一部としてその基板を使用し、自動的に判定を行うことが可能となる。システム構成例は、図32に示される。

【0515】

好ましい実施形態において、本発明の判定方法では、生物学的因子は核酸分子であり、前記細胞は該核酸分子でトランスフェクトされる、請求項52に記載の方法。ここで、トランスフェクション技術は、どのような物を利用してもよいが、好ましくは、遺伝子導入試薬を用いることが有利である。さらに好ましくは、塩、アクチン作用物質などを用いて固相支持体上でトランスフェクトされることが好ましい。トランスフェクトは固相上で行われても液相中で行われてもよいが、好ましくは固相上で行われ得ることが有利である。

【0516】

本発明の判定方法では、対象とする生物学的因子は、別の生物学的因子に結合する能力



を有するものであってもよい。このような性質を持っている生物学的因子を調べることによって、細胞中のネットワーク機構が解明され得るからである。

【0517】

本発明の判定方法でもまた、判定工程は、プロファイルの位相の比較、コントロールプロファイルとの差分収集、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理を行うことを包含し得る。このような処理方法は、当該分野において周知であり、本明細書において詳細に説明されている。

【0518】

別の局面において、本発明は、外来因子と、該外来因子に対する細胞の応答とを相関付ける方法を提供する。ここで、この方法は、a) 細胞を、複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上で、外来因子に曝露する工程；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；およびc) 該外来因子と、該プロファイルとを相関付ける工程；包含する。ここで、外来因子への曝露は、細胞と外来因子とを接触する環境に配置することによって達成される。例えば、細胞が支持体上に固定されているとき、その支持体上にその外来因子を加えることによって、曝露が達成され得る。データの生成および相関付けの方法もまた、当該分野において周知であり、そのような生成および相関付けの方法として、通常のデータ処理を用いるかそれを組み合わせて使用することができる。統計学的処理を行い、統計学的に有意なデータおよび情報を生成することが好ましい。

【0519】

好ましい実施形態において、本発明の相関付け方法では、細胞は、支持体に固定されていてもよい。固定されることによって、データの規格化が容易になり、データ処理が格段に効率化される。

【0520】

好ましい実施形態において、本発明の相関付け方法では、少なくとも2つの前記外来因子を使用して、各外来因子に対するプロファイルを得る工程をさらに包含し得る。このようなプロファイルを得る技術は、本明細書において十分に説明されている。

【0521】

より好ましくは、相関付けは、少なくとも2つのプロファイルを類別することにより、該プロファイルに対応する外来因子を類別する工程をさらに包含してもよい。類別化することによって、より規格化されたデータ処理が可能となる。

【0522】

好ましい実施形態では、本発明において得られるプロファイルはリアルタイムで提示されるが、データの格納を目的とする場合は、特にリアルタイムでなくてもよい。

【0523】

好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞は、アレイ上で培養され得る。したがって、そのような場合、細胞は培地で覆われていることが好ましい。培地としては、通常細胞に使用する培地であればどのような培地でも使用され得る。

【0524】

本発明の好ましい実施形態では、プロファイルのモニターは、前記アレイから画像データを得ることを包含する。特に、プロファイルが、視覚情報（例えば、遺伝子発現による蛍光の発光）である場合は、画像データを得ることによって、プロファイルを得ることが可能になるからである。

【0525】

本発明の相関付け方法では、外来因子とプロファイルとを相関付ける工程は、前記プロファイルの位相の異同を識別する工程を包含し得る。位相の異動の判別は、本発明がプロファイルを初めて経時的に、かつ、同一環境で提供することによって達成される特徴である。

【0526】

本発明が対象とする外来因子は、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤

外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧からなる群から選択され得る。好ましくは、化学物質は、生体分子、化学合成物または培地であり得る。そのような生体分子としては、例えば、核酸分子、タンパク質、脂質、糖、プロテオリビッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンなどが挙げられるがそれらに限定されない。生体分子はまた、例えば、ホルモン、サイトカイン、細胞接着因子および細胞外マトリクスなどであってもよい。あるいは、化学物質は、レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストであってもよい。

#### 【0527】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法に関する。この方法は、a) 細胞に、同一環境を保つことができる支持体上で、複数の既知の外来因子を曝露する工程；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターし、既知の外来因子の各々に対する該細胞のプロファイルを得て該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；c) 該既知の外来因子の各々と、該プロファイルの各々とを相関付ける工程；d) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；e) 外来因子に曝露された該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する該細胞のプロファイルを得る工程；f) 該工程（b）で得られたプロファイルの中から、該工程（e）で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決する工程；およびg) 該未同定の外来因子は、該工程（f）において決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子であることを決定する工程；を包含する。ここで、外来因子の曝露、データ生成、相関付け、未同定の外来因子の曝露などは、本明細書において他の場所において詳述されており、当業者はこれらの記述を参照して、目的に応じて適宜適切な形態を選択することができる。

#### 【0528】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法を提供する。この方法は、a) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体に、既知の外来因子と、該既知の外来因子に対応する該細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する工程；b) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、該細胞のプロファイルを得る工程；d) 該工程（a）において提供された、該プロファイルの中から、該工程（c）において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決する工程；およびe) 該未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子であることを決定する工程；を包含する。ここで、外来因子の曝露、データ生成、相関付け、未同定の外来因子の曝露などは、本明細書において他の場所において詳述されており、当業者はこれらの記述を参照して、目的に応じて適宜適切な形態を選択することができる。

#### 【0529】

別の局面において、本発明は、複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを得る方法を提供する。この方法は、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；およびb) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルを得る工程、を包含する。ここで、外来因子の曝露、データ生成、相関付け、未同定の外来因子の曝露などは、本明細書において他の場所において詳述されており、当業者はこれらの記述を参照して、目的に応じて適宜適切な形態を選択することができる。

#### 【0530】

別の局面において、本発明は、本発明の細胞プロファイルデータを生成する方法によって生成されたデータが格納される記録媒体に関する。格納形式はどのようなものであってもよく、記録媒体もまた、どのような媒体であってもよい。例えば、そのような記録媒体としては、CD-ROM、フレキシブルディスク、CD-R、CD-RW、MO、ミニディスク、DVD-ROM、DVD-R、メモリースティック、ハードディスクなどが挙げ

られるがそれらに限定されない。本発明はまた、本発明の細胞プロフィールデータを生成する方法によって生成されたデータが格納される伝送媒体に関する。伝送媒体としては、例えば、イントラネット、インターネットなどのネットワークが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0531】

本発明の記録媒体または伝送媒体は、前記モニターにおける条件に関する情報、前記プロフィールに関する情報、前記細胞の状態に関する情報および前記生物学的因子に関する情報からなる群より選択される、少なくとも1つの情報に関するデータをさらに含んでもよい。このような情報に関するデータは、相互にリンクされた形態で格納されてもよい。好ましくは、これらのデータは規格化されることが有利である。規格化されることによって、一定の流通経路に載せることが可能になるからである。上記リンクは各々の細胞ごとにリンクされるか、あるいは生物学的因子ごとにリンクされるか、あるいはその両方であってもよい。

#### 【0532】

別の局面において、本発明は、本発明の細胞プロフィールデータを生成する方法によって生成されたデータに関する。このようなデータは、従来の技術では生成し得なかったデータであることから、全く新規であるといえる。

#### 【0533】

別の局面において、本発明は、同一環境にある複数の細胞の情報に関するプロフィールデータを生成するシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；およびc) 該モニター手段から得られた信号から該細胞のプロフィールのデータを生成する手段；を備える。同一環境に保つことができる支持体は、本発明によって初めて提供された技術を用いて当業者が実施することができる。そのような技術とは、細胞を固定化し、壁のない状態で細胞を配列することができることに起因する。モニター手段としては、例えば、顕微鏡（例えば、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相差顕微鏡など）、電子顕微鏡、スキャナー、肉眼、赤外線カメラ、共焦点・非共焦点顕微鏡、CCDカメラ、などが挙げられるがそれらに限定されない。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0534】

本発明のシステムは、システムとして実施されるときには、細胞を最初から含んでいる必要はないが、好ましくは、複数の細胞が含まれており、かつ、支持体に固定されていることが有利である。そのような場合、固定は、規格化されていることが好ましい。また、固定される場合、細胞間の距離としては、例えば、1mmなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0535】

好ましい実施形態では、支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも1つの物質が付着されることが好ましい。このように塩およびアクチン作用物質のいずれか、好ましくは両方が付着されることによって、固定および／または細胞内物質導入の効果が増強されるからである。

#### 【0536】

本発明のシステムにおいて使用され得るモニター手段としては、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴（SPR）イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干渉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラなどが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、スキャナー、例えば、白色光源もしくはレーザーによって基盤表面をスキャンするスキャナーを使用する。スキャナーが好ましいのは、蛍光であれば励起エネルギーを効率よく伝達すること、顕微鏡技術を流用することが容易であるという利点があるからである。さらに、細胞に対して大きなダメージを与えることなく測定できるという利点を有するからである。

システム構成例は、図 3 2 に示される。

【0 5 3 7】

別の局面において、本発明は、複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロフィールを提示するシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；c) 該モニター手段から得られた信号から該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；および

d) 該データを提示する手段、を包含する。ここで、支持体、モニター手段、データ生成手段については、本明細書において他の場所に記載されるように実施することができる。データを提示する手段もまた、当該分野において周知の手段を利用することができる。そのようなデータ提示手段としては、コンピュータのディスプレイ、スピーカなどが挙げられるがそれらに限定されない。システム構成例は、図 3 2 に示される。

【0 5 3 8】

本発明の提示システムは、複数の細胞をさらに含み、該複数の細胞は前記支持体に固定されていることが好ましい。このような場合、支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの物質が付着される。このような物質が使用されることによって、固定が強化され、および／または外来物質の細胞内導入が増強されるからである。

【0 5 3 9】

モニター手段は、どのようなものであってもよく、例えば、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段などであり得る。

【0 5 4 0】

データ提示手段は、どのようなものであってもよく、例えば、ディスプレイ、スピーカなどが挙げられる。

【0 5 4 1】

別の局面において、本発明は、細胞の状態を判定するシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；c) 該モニター手段から得られた信号からデータを生成する手段；および d) 該データから該細胞の状態を外挿する手段、を備える。ここで、支持体、モニター手段およびデータ生成手段は、本明細書において他の場所において記載したように当業者は実施することができる。データから細胞の状態を外挿する手段もまた、当該分野において周知の技術を用いて作製し、使用することができる。例えば、測定されたデータと、既知の細胞に関する標準データとを比較することによって外挿が達成され、そのような外挿のためのプログラムを格納したデバイスまたはそれを実行することができるコンピュータをそのような外挿手段として使用することができる。システム構成例は、図 3 2 に示される。

【0 5 4 2】

別の局面において、本発明は、外来因子と、該外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 外来因子を曝露する手段；c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；d) 該モニター手段からの信号から、該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および e) 該外来因子と、該プロフィールとを相関付ける手段；

を備える。ここで、支持体、モニター手段、データ生成手段は本明細書において他の場所において説明したように実施することができる。外来因子を曝露する手段もまた、その外来因子の性質に応じて当業者が適宜設計し、実施することができる。相関付けの手段もまた、その相関付けのためのプログラムを格納した記録媒体またはそれを実行することができるコンピュータを利用することができる。好ましくは、本発明のシステムは、複数の細

胞を含む。システム構成例は、図 3 2 に示される。

#### 【0 5 4 3】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 既知の外来因子を曝露する手段；c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；d) 外来因子の各々に対する該細胞のプロファイルを得て該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；e) 該既知の外来因子の各々と、該プロファイルの各々とを相関付ける手段；f) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；g) 該手段（d）で得られた既知の外来因子のプロファイルと、未知の外来因子のプロファイルとを比較し、既知の外来因子のプロファイルの中から、未知の外来因子のプロファイルに対応するプロファイルを決める手段であって、該決定された未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子である、手段、を備える。ここで、支持体、曝露手段、モニター手段、データ生成手段、相関付け手段、別の曝露手段は、本明細書における他の場所の記載を参酌して、当業者は適宜適切な携帯で実施することができる。また、対応するプロファイルを決める手段もまた、そのような決定プロセスを実行するプログラムを格納した記録媒体とそのプログラムを実行するコンピュータとを利用することなどによって、実施することができる。好ましくは、このシステムは、複数の細胞を含む。システム構成例は、図 3 2 に示される。

#### 【0 5 4 4】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムを提供する。このシステムは、a) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、該既知の外来因子に対応する該細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータが格納された記録媒体；b) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；c) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；d) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；e) 該モニター手段から得られた信号から、該細胞のプロファイルを得る手段；f) 該記録媒体（a）において格納される該プロファイルの中から、未知の外来因子に関して得られたプロファイルに対応するプロファイルを決める手段であって、該未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子である、手段；を備える。ここで、支持体、曝露手段、モニター手段、データ生成手段、相関付け手段、別の曝露手段は、本明細書における他の場所の記載を参酌して、当業者は適宜適切な携帯で実施することができる。また、対応するプロファイルを決める手段もまた、そのような決定プロセスを実行するプログラムを格納した記録媒体とそのプログラムを実行するコンピュータとを利用することなどによって、実施することができる。好ましくは、このシステムは、複数の細胞を含む。システム構成例は、図 3 2 に示される。

#### 【0 5 4 5】

別の局面において、本発明は、複数の細胞の環境を同一に維持することができる支持体に関する。このような支持体は、本発明によって始めて提供された。このような支持体を利用することによって、複数の細胞の同一環境下での分析が可能になった。

#### 【0 5 4 6】

好ましくは、支持体上の細胞は、アレイ状に配置されていることが有利である。規格化された分析が可能となるからである。この場合、塩またはアクチン作用物質を含むことが好ましい。より好ましくは、正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を含むことが有利である。細胞の固定が容易になるからである。アクチン作用物質は、細胞への外来因子の導入効率を上げることから特に内部を分析する際に好ましい。したがって、本発明の好ましい実施形態では、塩およびアクチン作用物質を含み、さらに正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を含むことがさらに好ましい。

#### 【0 5 4 7】

本発明の支持体は、細胞が 1 mm の間隔で配置され得るという特徴を有する。このよう

な間隔で、壁のない環境を提示することは、従来不可能であった。したがって、本発明は、驚くべき効果および実用性を有するものである。

【0548】

好ましい実施形態では、本発明の支持体は、固定された細胞をさらに含んで提供される。より好ましい実施形態では、本発明の支持体は、固定された生物学的因子をさらに含んで提供される。

【0549】

好ましい実施形態では、上記生物学的因子は2種類以上固定される。このような生物学的因子は、核酸分子、タンパク質、糖、脂肪、代謝物、低分子、それらの複合体、ならびに物理的要素および／または時間的要素が入った因子からなる群より選択される因子であってもよい。

【0550】

より好ましい実施形態において、本発明の支持体には、細胞および生物学的因子が混合して固定される。生物学的因子と細胞とは、ここでは、。相互作用するように配置され得る。そのような相互作用は、生物学的因子によって変動するが、当業者はその性質を見れば、どのように相互作用するかおよびどのように配置すれば相互作用するかを理解することができる。

【0551】

好ましい実施形態にひとつにおいて、本発明の支持体には、塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともに固定される。

【0552】

より好ましい実施形態では、本発明の支持体には、塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともにアレイ状に固定される。このような構成をとることによって、細胞プロファイルデータを生成することができる、細胞チップが提供される。この支持体は、好ましくは、塩と、遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、核酸分子と、細胞とがアレイ状に固定されるという構成を採り、そのような支持体は、「トランスフェクションアレイ」とも呼ばれる。

【0553】

ここで、本発明の支持体で使用される塩としては、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンなどが挙げられるがそれらに限定されない。この塩としては、好ましくは、塩化ナトリウムなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0554】

本発明の支持体において使用される遺伝子導入試薬は、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウム、オリゴフェクタミンおよびオリゴフェクターなどが挙げられるがそれらに限定されない。この遺伝子導入試薬としては、好ましくは、リポフェクトアミン、オリゴフェクタミンおよびオリゴフェクターが挙げられるがそれらに限定されない。

【0555】

本発明の支持体において使用されるアクチン作用物質としては、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンが挙げられるがそれらに限定されない。このアクチン作用物質としては、好ましくは、フィブロネクチンが挙げられるがそれらに限定されない。

【0556】

本発明の支持体において使用される核酸分子としては、転写制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）、遺伝子コード配列、非翻訳領域を含むゲノム配列、宿主ゲノムにコードされていない核酸配列（蛍光タンパク質遺伝子、大腸菌・酵母自己複製起点、GAL4ドメイン等）を含む核酸分子が挙げられるがそれらに限定されない。この核酸分子としては、好ましくは、転写制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）、遺



伝子コード配列、非翻訳領域を含むゲノム配列が挙げられるがそれらに限定されない。

【0557】

本発明の支持体において使用される細胞としては、幹細胞、樹立細胞株、初代培養細胞、昆虫細胞、細菌細胞が挙げられるがそれらに限定されない。この細胞としては、好ましくは、幹細胞、樹立細胞株、初代培養細胞が挙げられるがそれらに限定されない。

【0558】

本発明の支持体において使用される支持体の材料は、ガラス、シリカ、およびプラスチックなどが挙げられるがそれらに限定されない。この材料としては、好ましくは、コーティングされた上記材料が挙げられるがそれらに限定されない。

【0559】

別の局面において、本発明は、固定された複数の細胞を含み、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する方法を提供する。この方法は、A) 支持体を提供する工程；およびB) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて該支持体上に固定する工程、を含む。支持体の提供は、市販のものを入手するか、あるいは、支持体材料を成型することをによって達成され得る。支持体材料を調製する必要があるときは、そのような材料の原料の混合などによって調製することができる。固定する工程もまた、当該分野において公知の技術を用いて行うことができるそのような固定技術としては、例えば、インクジェットプリント法、ピンアレイ法、スタンプ法が挙げられるがそれらに限定されない。そのような技術は、周知であり、当業者は適宜そのような技術を用いて実施することができる。

【0560】

好ましい実施形態において、本発明における固定工程は、前記塩と、前記正に荷電した物質としての遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、前記負に荷電した物質としての核酸分子と、前記細胞との混合物を、アレイ状に固定することを含む。このような固定は、プリント技術を用いて達成され得る。

【0561】

別の局面において、本発明は、固定された複数の細胞を含み、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する装置を提供する。この装置は、A) 支持体を提供する手段；およびB) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて該支持体上に固定する手段を備える。支持体の提供の実現は、上述の方法を行うことができる手段を用いて達成され得る。そのような手段としては、例えば、支持体の成型手段、材料の調製手段（例えば、混合手段）などが挙げられるがそれらに限定されない。成型手段は、当該分野において周知の技術を使用することができる。固定手段は、プリント手段を含み、そのような手段としては、市販のインクジェットプリンターを利用することが可能である。

【0562】

(デジタル細胞)

「デジタル細胞」とは、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データの集合をいう。これらの実験データは、現実の細胞に対して行った実験の実験条件と実験結果とを関連づけたものである。デジタル細胞は、実験条件が与えられると、その実験条件に関連する実験結果を再現可能なように構成されている。

【0563】

デジタル細胞を用いると、現実の細胞に対して行った実験の実験結果をコンピュータシステム上で再現することができる。これにより、実験設備を持たない研究機関や個人においても、細胞に関する最先端の研究を行うことが可能になる。その結果、従来はこの分野に参入することが不可能であった異業種からもこの分野に参入することが可能になる。

【0564】

図33Aは、デジタル細胞のデータ構造の一例を示す。この例では、デジタル細胞は、細胞Aに対する3つの実験データA1、A2、A3の集合として表現されている。

【0565】



実験データ A1、A2、A3 のそれぞれは、実験条件を示すパラメータとして細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとを含み、実験結果として刺激応答結果を含む。

#### 【0566】

ここで、細胞パラメータは、実験対象の細胞を特定する。環境パラメータは、細胞パラメータによって特定された細胞を培養する環境を特定する。刺激パラメータは、細胞パラメータによって特定された細胞に与える刺激を特定する。刺激応答結果は、環境パラメータによって特定された環境下で細胞パラメータによって特定された細胞が刺激パラメータによって特定された刺激に対して応答した結果を示す。

#### 【0567】

実験データ A1 は、「DMEM」という培地を用いて pH「7」、温度「37」度、C O<sub>2</sub> 濃度「5」%という培地条件で細胞 A を培養し、「Tet-OFF CMV EGF」、「CMV EGFP」というレポーターと「Doxycyclene」という化学刺激（薬剤）からなる刺激を細胞 A に与えることにより、刺激応答結果が得られたことを示す。この刺激応答結果は、「細胞動態データ 1」と「レポーター計測データ 1」とによって表される。

#### 【0568】

実験データ A2 は、「DMEM」という培地を用いて pH「7」、温度「37」度、C O<sub>2</sub> 濃度「5」%という培地条件で細胞 A を培養し、「c-fos」というレポーターと「PSC833」という化学刺激（薬剤）からなる刺激を細胞 A に与えることにより、刺激応答結果が得られたことを示す。この刺激応答結果は、「細胞動態データ 2」と「レポーター計測データ 2」とによって表される。

#### 【0569】

実験データ A3 は、「DMEM」という培地を用いて pH「5」、温度「39」度、C O<sub>2</sub> 濃度「4」%という培地条件で細胞 A を培養し、「CREB」というレポーターと「Vindesine」という化学刺激（薬剤）からなる刺激を細胞 A に与えることにより、刺激応答結果が得られたことを示す。この刺激応答結果は、「細胞動態データ 3」と「レポーター計測データ 3」とによって表される。

#### 【0570】

このように、実験条件を示すパラメータ（細胞パラメータ、環境パラメータおよび刺激パラメータ）と実験結果を示す刺激応答結果とが関連づけられている。これらを関連づけたものを実験データという。デジタル細胞は、実験対象の細胞に対する少なくとも 1 つの実験データの集合として提供される。

#### 【0571】

図 33B は、デジタル細胞のデータ構造の他の一例を示す。この例は、図 33A に示されるデータ構造を階層化したものである。このようにデジタル細胞のデータ構造を階層化することにより、図 33A に示されるデータ構造に比べて少ないデータ量で同一の内容を表現することが可能になる。

#### 【0572】

なお、図 33A、図 33B に示される例では、実験条件を示すパラメータと実験結果とは単方向リンク（図中の矢印）によって関連づけられている。しかし、これらを関連づける方法はこれに限定されない。これらを関連づける方法としては任意の方法を採用することができる。

#### 【0573】

（デジタル細胞の生産）

図 34 は、デジタル細胞を生産する処理の手順の一例を示す。この処理は、任意のタイプのコンピュータによって実行される。

#### 【0574】

ステップ S3401：実験対象の細胞を特定する細胞パラメータが取得される。細胞パラメータの取得は、例えば、ユーザによって入力された細胞パラメータをコンピュータが

受け取ることによって行われる。あるいは、実験装置から出力されるデータをコンピュータが自動的に収集もしくは解析することによって細胞パラメータを取得するようにしてもよい。

#### 【0575】

ステップS3402：細胞パラメータによって特定された細胞を培養する環境を特定する環境パラメータが取得される。環境パラメータの取得は、例えば、ユーザによって入力された環境パラメータをコンピュータが受け取ることによって行われる。あるいは、実験装置（例えば、実験環境を計測するセンサなど）から出力されるデータをコンピュータが自動的に収集もしくは解析することによって環境パラメータを取得するようにしてもよい。環境パラメータは、例えば、細胞を培養する培地を示すパラメータと、その培地の条件を示すパラメータとを含む。培地の条件としては、例えば、培地のpH、温度、CO<sub>2</sub>濃度などが挙げられる。

#### 【0576】

ステップS3403：細胞パラメータによって特定された細胞に与える刺激を特定する刺激パラメータが取得される。刺激パラメータの取得は、例えば、ユーザによって入力された刺激パラメータをコンピュータが受け取ることによって行われる。あるいは、実験装置から出力されるデータをコンピュータが自動的に収集もしくは解析することによって刺激パラメータを取得するようにしてもよい。刺激パラメータは、例えば、レポーターを示すパラメータと、化学刺激を示すパラメータとを含む。

#### 【0577】

ステップS3404：環境パラメータによって特定された環境下で細胞パラメータによって特定された細胞が刺激パラメータによって特定された刺激に対して応答した結果を示す刺激応答結果が取得される。刺激応答結果の取得は、例えば、実験装置（例えば、実験経過をモニターするモニター装置など）から出力されるデータをコンピュータが自動的に収集もしくは解析することによって行われる。

#### 【0578】

ステップS3405：細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータと刺激応答結果とが関連づけられる。この関連づけにより、実験対象の細胞に対する1つの実験データが生成される。このような関連づけは、例えば、図33Aに示されるように単方向のリンクを用いて行われる。しかし、関連づけの方法は問わない。

#### 【0579】

ステップS3406：ステップS3401～ステップS3405が必要に応じて繰り返される。これにより、実験対象の細胞に対する少なくとも1つの実験データが生成される。この少なくとも1つの実験データの集合がデジタル細胞として提供される。

#### 【0580】

デジタル細胞を生産する処理を実行するコンピュータは、デジタル細胞を生産する装置として機能する。生産されたデジタル細胞は、例えば、そのコンピュータがアクセス可能なデータベースに格納される。

#### 【0581】

このように、少なくとも1つの実験データの集合をデジタル細胞として提供することは、複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する技術が本発明者によって開発されてはじめて可能となった。従来の技術では、複数の細胞を同一環境下に保つことができなかったため、実験条件に信頼性がなく、これらの実験データを集積する意義がなかったからである。この意味で、「デジタル細胞の生産」は、本発明者の技術革新を通してはじめて可能になった先端技術であるというべきである。

#### 【0582】

（現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスの提供）

図35は、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコンピュータシステム3501の構成の一例を示す。

#### 【0583】

コンピュータシステム 3501 は、ユーザが所望するサービスをリクエストするサービスリクエスト 3510 と、そのリクエストに回答して所定のサービスを提供するサービスプロバイダ 3520 とを含む。

【0584】

コンピュータシステム 3501 は、複数のサービスリクエスト 3510 を含んでもよい。

【0585】

サービスプロバイダ 3520 は、少なくとも 1 つのデジタル細胞を格納したデータベース 3522 にアクセス可能なように構成されている。データベース 3522 に格納されたデジタル細胞のデータ構造は、例えば、図 33A、図 33B に示されるとおりである。データベース 3522 は、サービスプロバイダ 3520 の内部に設けられていてもよいし、サービスプロバイダ 3520 の外部に設けられていてもよい。

【0586】

サービスプロバイダ 3520 は、少なくとも 1 つのデジタル細胞をそれぞれ格納した複数のデータベースにアクセス可能なように構成されていてもよい。

【0587】

サービスリクエスト 3510 およびサービスプロバイダ 3520 のそれぞれは、任意のタイプのコンピュータであり得る。

【0588】

サービスリクエスト 3510 とサービスプロバイダ 3520 とは、ネットワーク 3530 を介して接続されている。ネットワーク 3530 は、任意のタイプのネットワークであり得るが、接続の容易性やコストを考慮すると、インターネットであることが最も好ましい。

【0589】

ネットワーク 3530 がインターネットである場合には、サービスリクエスト 3510 は、ユーザが操作する Web ブラウザであり得、サービスプロバイダ 3520 は、インターネットを介してサービスリクエスト 3510 に接続される Web サーバーであり得る。このような構成をとることにより、世界中のユーザがサービスプロバイダ 3520 に容易にアクセスすることが可能になる。

【0590】

図 36 は、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供する処理の手順の一例を示す。この処理は、サービスリクエスト 3510 とサービスプロバイダ 3520 とが協働することにより実行される。

【0591】

ステップ S3601: サービスリクエスト 3510 は、細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとを受け取り、細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとを含むリクエストを生成する。そのリクエストは、例えば、XML で記述されている。

【0592】

ステップ S3602: サービスリクエスト 3510 は、そのリクエストをサービスプロバイダ 3520 に提供する。

【0593】

ステップ S3603: サービスプロバイダ 3520 は、そのリクエストに回答してデータベース 3522 を検索し、データベース 3522 内にそのリクエストに含まれる細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとに関連する刺激応答結果が存在するか否かを決定する。

【0594】

ステップ S3604: データベース 3522 内にそのリクエストに含まれる細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとに関連する刺激応答結果が存在すると決定された場合には、サービスプロバイダ 3520 は、その刺激応答結果をサービスリクエスト 3510 に提供する。その刺激応答結果は、例えば、XML で記述されている。

## 【0595】

ステップ S3605: サービスリクエスト 3510 は、サービスプロバイダ 3520 によって提供された刺激応答結果を表示する。

## 【0596】

なお、データベース 3522 内にそのリクエストに含まれる細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとに関連する刺激応答結果が存在しないと決定された場合には、サービスプロバイダ 3520 は、例えば、「該当なし」という結果をサービスリクエスト 3510 に提供する。

## 【0597】

なお、図 36 に示される処理を単一のコンピュータで処理することも可能である。例えば、図 36 に示されるステップ S3601～S3605 の処理を単一のコンピュータによって実行される単一のプログラムで実現すればよい。この場合、その単一のコンピュータは、サービスリクエスト 3510 の機能とサービスプロバイダ 3520 の機能とを併せ持つ装置として機能する。

## 【0598】

図 37 は、サービスリクエスト 3510 に細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとを入力する入力画面の一例を示す。この例では、これらのパラメータは、入力画面の所定の領域にユーザがテキストを入力することにより入力される。

## 【0599】

なお、これらのパラメータをサービスリクエスト 3510 に入力する方法としては任意の方法を採用することができる。例えば、これらのパラメータをユーザがメニュー（例えば、プルダウンメニュー、ポップアップメニュー）を選択することにより入力するようにしてもよい。

## 【0600】

サービスリクエスト 3510 が刺激応答結果を表示する態様としては任意の態様を採用することができる。例えば、サービスリクエスト 3510 は、刺激応答結果をディスプレイに表示してもよいし、刺激応答結果をプリンタに出力してもよい。サービスリクエスト 3510 は、刺激応答結果を静止画を用いてディスプレイに表示してもよいし、動画を用いてディスプレイに表示してもよい。

## 【0601】

刺激応答結果は、例えば、細胞上または細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターすることによって得られる細胞のプロファイルのデータを含み得る。この場合には、刺激応答結果として、例えば、図 19 に示されるような細胞のプロファイルのデータがサービスリクエスト 2510 によって表示される。

## 【0602】

このように、コンピュータシステム 3501 によれば、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供することが可能になる。これにより、実験設備を持たない研究機関や個人においても、細胞に関する最先端の研究を行うことが可能になる。

## 【0603】

図 38 は、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコンピュータシステム 3801 の構成の一例を示す。

## 【0604】

コンピュータシステム 3801 は、ユーザが所望するサービスをリクエストするサービスリクエスト 3810 と、そのリクエストに応答して所定のサービスを提供する複数のサービスプロバイダ 3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub> と、複数のサービスプロバイダ 3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub> が提供可能な少なくとも 1 つのサービスを登録したサービスレジストリ 3840 とを含む。ここで、N は 2 以上の任意の整数である。

## 【0605】

コンピュータシステム 3801 は、複数のサービスリクエスト 3810 を含んでいても

よい。

【0606】

サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>は、少なくとも1つのデジタル細胞を格納したデータベース3822<sub>i</sub>にアクセス可能なように構成されている。データベース3822<sub>i</sub>に格納されたデジタル細胞のデータ構造は、例えば、図33A、図33Bに示されるとおりである。データベース3822<sub>i</sub>は、サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>の内部に設けられていてもよいし、サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>の外部に設けられていてもよい。ここで、 $i = 1, 2, \dots, N$ である。

【0607】

なお、サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>は、少なくとも1つのデジタル細胞をそれぞれ格納した複数のデータベースにアクセス可能なように構成されていてもよい。

【0608】

サービスレジストリ3840は、サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>が提供可能なサービスを表すデータを格納したデータベース3842にアクセス可能なように構成されている。データベース3842は、サービスレジストリ3840の内部に設けられていてもよいし、サービスレジストリ3840の外部に設けられていてもよい。データベース3842にサービスを表すデータを格納することにより、サービスレジストリ3840にサービスを登録することができる。データベース3842に格納されるデータのフォーマットは予め標準化されていることが好ましい。データベース3842へのデータの格納は、サービスレジストリ3840を管理する会社が人手で行ってもよいし、サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>からネットワーク3830を介してサービスレジストリ3840にデータを送信することによって行ってもよい。

【0609】

サービスリクエスト3810、サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>およびサービスレジストリ3840のそれぞれは、任意のタイプのコンピュータであり得る。

【0610】

サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>のそれぞれは、実験設備を持ち現実の細胞を研究している研究機関、企業または団体によって運営されることが好ましい。サービスリクエスト3810およびサービスレジストリ3840のそれぞれは、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスの提供を統括する研究機関、企業または団体（例えば、デジタル細胞推進協議会）によって運営されることが好ましい。また、サービスレジストリ3840に登録されるサービスの品質を保証するために、サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>の運営機関に一定の基準を満たすことを義務づけることが好ましい。

【0611】

サービスリクエスト3810とサービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>とサービスレジストリ3840とは、ネットワーク3830を介して接続されている。ネットワーク3830は、任意のタイプのネットワークであり得るが、接続の容易性やコストを考慮すると、インターネットであることが最も好ましい。

【0612】

ネットワーク3830がインターネットである場合には、サービスリクエスト3810は、インターネットを介してユーザが操作するWebブラウザに接続されるWebサーバーであり得、サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>のそれぞれは、インターネットを介してサービスリクエスト3810に接続されるWebサーバーであり得る。この場合、サービスリクエスト3810は、ユーザが操作するWebブラウザとサービスプロバイダ3820<sub>i</sub>のWebサーバーとを中継するポータル・Webサイトとして機能する。このような構成をとることにより、世界中のユーザがサービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>に容易にアクセスすることが可能になるとともに、世界中の研究機関や企業がデジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するビジネスに参画することが可能になる。

**【0613】**

図39は、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供する処理の手順の一例を示す。この処理は、サービスリクエスタ3810とサービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>とが協働することにより実行される。

**【0614】**

ステップS3901: サービスリクエスタ3810は、細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとを受け取り、細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとを含むリクエストを生成する。そのリクエストは、例えば、XMLで記述されている。

**【0615】**

ステップS3902: サービスリクエスタ3810は、そのリクエストに回答してサービスレジストリ3840を検索し、サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>の中にそのリクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダ3820<sub>i</sub>が存在するか否かを決定する。ここで、iは、1からNのいずれかを示す。

**【0616】**

サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>が提供可能なサービスをサービスレジストリ3840に登録しておく方法としては任意の方法を採用することができる。例えば、サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>が細胞Aに対する実験結果を再現するサービスを提供可能である場合には、細胞Aを特定する細胞パラメータとサービスプロバイダ3820<sub>1</sub>の位置を特定するアドレス（例えば、URL）とをデータベース3842に格納しておけばよい。例えば、サービスプロバイダ3820<sub>2</sub>が細胞B、細胞Cに対する実験結果を再現するサービスを提供可能である場合には、細胞B、細胞Cを特定する細胞パラメータとサービスプロバイダ3820<sub>2</sub>の位置を特定するアドレス（例えば、URL）とをデータベース3842に格納しておけばよい。あるいは、サービスプロバイダ3820<sub>3</sub>が細胞Dに対する特定の試験条件を満たす実験結果を再現するサービスを提供可能である場合には、細胞Dを特定するパラメータとその試験条件を特定するためのパラメータ（例えば、環境パラメータ、刺激パラメータ）とサービスプロバイダ3820<sub>3</sub>の位置を特定するアドレス（例えば、URL）とをデータベース3842に格納しておくようにしてもよい。

**【0617】**

ステップS3903: サービスプロバイダ3820<sub>1</sub>～3820<sub>N</sub>の中にそのリクエストのサービスを提供可能なサービスプロバイダ3820<sub>i</sub>が存在すると決定された場合には、サービスリクエスタ3810は、そのリクエストをサービスプロバイダ3820<sub>i</sub>に提供する。サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>の位置は、サービスレジストリ3840のデータベース3842を参照することによって特定され得る。

**【0618】**

ステップS3904: サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>は、そのリクエストに回答してデータベース3822<sub>i</sub>を検索し、データベース3822<sub>i</sub>内にそのリクエストに含まれる細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとに関連する該刺激応答結果が存在するか否かを決定する。

**【0619】**

ステップS3905: データベース3822<sub>i</sub>内にそのリクエストに含まれる細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとに関連する刺激応答結果が存在すると決定された場合には、サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>は、その刺激応答結果をサービスリクエスタ3810に提供する。その刺激応答結果は、例えば、XMLで記述されている。

**【0620】**

ステップS3906: サービスリクエスタ3810は、サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>によって提供された刺激応答結果を表示する。

**【0621】**

なお、データベース3822<sub>i</sub>内にそのリクエストに含まれる細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとに関連する刺激応答結果が存在しないと決定された場合には、サービスプロバイダ3820<sub>i</sub>は、例えば、「該当なし」という結果をサービスリクエ

スタ 3810 に提供する。

【0622】

また、細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとをサービスリクエスト 3810 に入力する方法として任意の方法を採用し得ること、サービスリクエスト 3810 が刺激応答結果を表示する態様として任意の態様を採用し得ることは、上述したとおりである。

【0623】

このように、コンピュータシステム 3801 によれば、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供することが可能になる。これにより、実験設備を持たない研究機関や個人においても、細胞に関する最先端の研究を行うことが可能になる。さらに、コンピュータシステム 3801 によれば、複数のサービスプロバイダ 3820<sub>1</sub> ~ 3820<sub>N</sub> が提供可能なサービスをサービスレジストリ 3840 に登録することによって、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するビジネスに参画する機会を世界中の研究機関や企業に与えることが可能になる。

【0624】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0625】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。当業者は、以下の実施例から、適宜細胞、支持体、生物学的因子、塩、正に荷電した物質、負に荷電した物質、アクチン作用物質などを選択し、実施することができることが理解される。

【実施例】

【0626】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。以下の実施例において用いられる試薬、支持体などは、例外を除き、Sigma (St. Louis, USA、和光純薬 (大阪、日本)、松浪硝子 (岸和田、日本) などから市販されるものを用いた。

【0627】

(実施例 1: 試薬)

この実施例において調製したものは以下のとおりである。

【0628】

アクチン作用物質の候補として、種々の細胞外マトリクスタンパク質およびその改変体もしくはそのフラグメントを準備した。この実施例において調製したものは以下のとおりである。フィブロネクチンなどは、市販のものを用い、フラグメントおよび改変体は、遺伝子操作して改変したものを用いた。

- 1) フィブロネクチン (配列番号 11) ;
- 2) フィブロネクチン 29 kDa フラグメント ;
- 3) フィブロネクチン 43 kDa フラグメント ;
- 4) フィブロネクチン 72 kDa フラグメント ;
- 5) フィブロネクチン改変体 (配列番号 11 のうち、152 位のアラニンをロイシンに変化させたもの) ;
- 6) プロネクチン F (三洋化成、京都、日本) ;
- 7) プロネクチン L (三洋化成) ;
- 8) プロネクチン Plus (三洋化成) ;
- 9) ラミニン (配列番号 6、8 および 10) ;
- 10) RGD ペプチド (トリペプチド) ;



- 11) RGDを含んだ30kDaペプチド;
- 12) ラミニンの5アミノ酸 (IKVAV);
- 13) ゼラチン。

**【0629】**

DNAとしてトランスフェクションのためのプラスミドを調製した。プラスミドとして、pEGFP-N1およびpDsRed2-N1 (ともにBD Biosciences, Clontech, CA, USA) を用いた。これらのプラスミドでは、遺伝子発現はサイトメガロウイルス (CMV) の制御下にある。プラスミドDNAを、E. coli (XL1 blue, Stratgene, TX, USA) 中で増幅し増幅したプラスミドDNAを複合体パートナーの一方として用いた。DNAは、DNaseもRNaseも含まない蒸留水中に溶解した。

**【0630】**

使用したトランスフェクション試薬は以下の通りである: Effectene Transfection Reagent (cat. no. 301425, Qiagen, CA), TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Promega, WI), Tfx™-20 Reagent (E2391, Promega, WI), SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA), LipofectAMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen corporation, CA), JetPEI (×4) conc. (101-30, Polyplus-transfection, France) およびExGen 500 (R0511, Fermentas Inc., MD)。トランスフェクション試薬は、上記DNAおよびアクチン作用物質にあらかじめ加えるかあるいはDNAと複合体を先に生成してから使用した。

**【0631】**

このようにして調製した溶液を以下のトランスフェクションアレイを用いたアッセイに用いた。

**【0632】**

(実施例2: トランスフェクションアレイ-間葉系幹細胞を用いた実証)

本実施例では、固相におけるトランスフェクション効率の改善を観察した。そのプロトコルを以下に示す。

**【0633】**

(プロトコル)

DNAの最終濃度は、 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した。アクチン作用物質は、ddH<sub>2</sub>O中で $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のストックとして保存した。全ての希釈をPBS、ddH<sub>2</sub>OまたはダルベッコMEM培地を用いて行った。希釈系列として、例えば、 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.27\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.53\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.8\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.07\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.33\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、などを調製した。

**【0634】**

トランスフェクション試薬は、それぞれの製造業者が提供する指示書に従って、使用した。

**【0635】**

プラスミドDNA: グリセロールストックから100mLのL-amp中で一晩増殖させ、Qiaprep MiniprepまたはQiagen Plasmid Purification Maxiを用いて製造業者が提供する標準プロトコルによって精製した。

**【0636】**

本実施例では、以下の5種類の細胞を利用して、効果を確認した: ヒト間葉系幹細胞 (

hMSCs、PT-2501、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)、ヒト胚性腎細胞 (HEK293、RCB1637、RIKEN Cell Bank, JPN)、NIH3T3-3細胞 (RCB0150, RIKEN Cell Bank, JPN)、HeLa細胞 (RCB0007、RIKEN Cell Bank, JPN) およびHepG2 (RCB1648、RIKEN Cell Bank, JPN)。これらは、L-glutおよびpen/strepを含むDMEM/10%IFS中で培養した。

#### 【0637】

(希釈およびDNAのスポット)

トランスフェクション試薬とDNAとを混合してDNA-トランスフェクション試薬複合体を形成させる。複合体形成にはある程度の時間が必要であることから、上記混合物を、アレイ作製機 (arrayer) を用いて固相支持体 (例えば、ポリ-レーリジンスライド) にスポットした。本実施例では、固相支持体として、ポリ-レーリジンスライドのほか、APSスライド、MASスライド、コーティングなしのスライドを用いた。これらは、松浪硝子 (岸和田、日本) などから入手可能である。

#### 【0638】

複合体形成およびスポット固定のために、真空乾燥機中で一晚スライドを乾燥させた。乾燥時間の範囲は、2時間から1週間とした。

#### 【0639】

アクチン作用物質は、上記複合体形成時に使用してもよいが、本実施例では、スポッティングの直前に使用する形態も試験した。

#### 【0640】

(混合液の調製および固相支持体への適用)

エッペンドルフチューブに、300  $\mu$ LのDNA濃縮緩衝液 (EC緩衝液) + 16  $\mu$ Lのエンハンサーを混合した。これをボルテックスによって混合し、5分間インキュベートした。50  $\mu$ Lのトランスフェクション試薬 (Effecteneなど) を加え、そしてピペッティングによって混合した。トランスフェクション試薬を適用するために、スライドのスポットのまわりにワックス環状バリアーを引いた。スポットのワックスで囲まれた領域に366  $\mu$ Lの混合物を加え、室温で10から20分間インキュベートした。これにより、支持体への手動による固定が達成された。

#### 【0641】

(細胞の分配)

次に、細胞を添加するプロトコルを示す。トランスフェクトのために細胞を分配した。この分配は、通常、フード内で試薬を減圧吸引して行った。スライドを皿に置き、そしてトランスフェクションのために細胞を含む溶液を加えた。細胞の分配は、以下のとおりである。

#### 【0642】

細胞の濃度が25 mL中 $10^7$ 細胞になるように、増殖中の細胞を分配した。四角の100  $\times$  100  $\times$  15 mmのペトリ皿または半径100 mm  $\times$  15 mmの円形ディッシュ中で、スライド上に細胞をプレーティングした。約40時間、トランスフェクションを進行させた。これは、約2細胞周期にあたる。免疫蛍光のためにスライドを処理した。

#### 【0643】

(遺伝子導入の評価)

遺伝子導入の評価は、例えば、免疫蛍光、蛍光顕微鏡検査、レーザー走査、放射性標識および感受性フィルムまたはエマルジョンを用いた検出によって達成した。

#### 【0644】

可視化されるべき発現されたタンパク質が蛍光タンパク質であるなら、それらを蛍光顕微鏡検査で見てもそして写真を撮ることができる。大きな発現アレイに関しては、スライドをデータ保存のためにレーザーキャナーで走査し得る。発現されたタンパク質を蛍光抗体が検出し得るなら、免疫蛍光のプロトコルを引き続き行うことができる。検出が放

射能に基づくなら、スライドを上記で示したように付着し得、そしてフィルムまたはエマルジョンを用いたオートラジオグラフィーによって放射能を検出することができる。

#### 【0645】

(レーザー走査および蛍光強度定量)

トランスフェクション効率を定量するために、本発明者らは、DNAマイクロアレイスキャナ (GeneTAC UC4×4、Genomic Solutions Inc., MI) を使用した。総蛍光強度 (任意の単位) を測定した後、表面積あたりの蛍光強度を計算した。

#### 【0646】

(共焦点顕微鏡による切片観察)

使用した細胞を、組織培養ディッシュに最終濃度  $1 \times 10^5$  細胞/ウェルで播種し、適切な培地を用いて (ヒト間葉系細胞の場合ヒト間葉系細胞基本培地 (MSCGM、Bullet Kit PT-3001、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD, USA) を用いた) 培養した。細胞層を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、染色試薬であるSYTOおよびTexas Red-Xファロイジン (Molecular Probes Inc., OR, USA) を細胞層に添加して、核およびFアクチンを観察した。遺伝子産物によって発色するサンプルまたは染色されたサンプルを共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510、Carl Zeiss Co., Ltd、ピンホールサイズ=Ch1=123  $\mu\text{m}$ 、Ch2=108  $\mu\text{m}$ ; 画像間隔=0.4) を用いて、切片像を得た。

#### 【0647】

(結果)

図1に一例としてHEK293細胞を用いた場合の種々のアクチン作用物質およびコントロールとしてのゼラチンを用いた結果を示す。

#### 【0648】

結果から明らかなように、ゼラチンを用いた系ではトランスフェクションがあまり成功していないのに対して、フィブロネクチン、フィブロネクチンの改変体であるプロネクチン (プロネクチンF、プロネクチンL、プロネクチンPlus) およびラミニンでは、顕著にトランスフェクションが起こっていた。従って、このような分子は、トランスフェクション効率を顕著に上昇させることが実証された。RGDペプチド単体では、その効果はほとんど見えなかった。

#### 【0649】

図2および3に、フィブロネクチンのフラグメントを用いた場合のトランスフェクション効率の結果を示す。図4にその結果をまとめた図を示す。29 kDaおよび72 kDaのフラグメントは、トランスフェクション活性が顕著に示され、43 kDaフラグメントは、活性はあるものの、その程度は、低かった。従って、29 kDaに含まれるアミノ酸配列がトランスフェクション効率の上昇に役割を果たしていることが示唆される。29 kDaフラグメントは、夾雑がほとんど見られなかったのに対して、他の二つのフラグメント (43 kDaおよび72 kDa) では、夾雑が見られた。従って、29 kDaドメインのみをアクチン作用物質として使用することが好ましくあり得る。また、RGDペプチドのみではトランスフェクション効率上昇活性は示されなかったが、これをつけた30 kDaのペプチドでは活性が見られた。また、ラミニンの6アミノ酸をつけ高分子量にした系でもトランスフェクション活性が見られた。従って、これらのペプチド配列もまた、トランスフェクション効率上昇活性において重要な役割を果たし得るがそれに限定されない。このような場合、少なくとも5 kDa、好ましくは少なくとも10 kDa、より好ましくは少なくとも15 kDaの分子量を含むことがトランスフェクション効率上昇に必要であり得る。

#### 【0650】

次に、種々の細胞におけるトランスフェクション効率を調べた結果を図5に示す。図5では、従来トランスフェクションが可能な細胞としてHEK293細胞、HeLa細胞、

3T3細胞、ならびに従来トランスフェクションがほとんど不可能といわれていたHepG2細胞および間葉系幹細胞(MSC)を用いた本発明のトランスフェクション方法の効果を示す。縦軸にはGFPの強度を示した。

#### 【0651】

図5では、本発明の固相支持体を用いたトランスフェクション法との比較対照として、従来の液相トランスフェクション法を示した対比した。従来型の液相トランスフェクションの方法は、キットを製造する製造会社の推奨する方法に従って行った。

#### 【0652】

図5から明らかなように、従来トランスフェクション可能とされていたHEK293、HeLa、3T3はもちろん、トランスフェクション不可能とされていたHepG2およびMSCでも、HeLaおよび3T3に匹敵するトランスフェクション効率が達成された。このような効果は、従来のトランスフェクション系では決して達成されなかったことであり、事実上すべての細胞についてトランスフェクション効率を上昇させることができ、実用に耐え得るトランスフェクションをすべての細胞に提供する系が史上初めて提供されたことになる。また、固相条件を採用したことによって、相互夾雑も顕著に減少した。従って、固相支持体を使用する場合本発明は、集積化バイオアレイを製造するために適切な方法であることが実証された。

#### 【0653】

次に図6として、種々のプレートを用いた場合のトランスフェクションの状態を示す結果を提供する。図6の結果からも明らかなように、コーティングをした場合、コーティングをしていない場合よりも夾雑が少なくなっており、トランスフェクション効率も上昇しているようであることが明らかになった。

#### 【0654】

次に、図7として、フィブロネクチンの濃度を0、0.27、0.53、0.8、1.07および1.33(それぞれ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )としてトランスフェクションを行った場合の結果を示す。図7では、PLL(ポリ-L-リジン)およびAPSでコーティングされたスライドおよびコーティングされていないスライドについて示す。

#### 【0655】

図7の結果から明らかなように、トランスフェクション効率は、フィブロネクチン濃度の上昇に伴って上昇することが明らかになった。ただし、PLLコーティングおよびコーティングなしの場合には、0.53 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を超えると効率がプラトーに達していることがわかる。他方、APSの場合は、1.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を超えても効果の上昇が見られた。

#### 【0656】

次に図8として、フィブロネクチンの有無での、細胞接着プロファイルを示す写真を示す。図9には、切片写真を示す。接着細胞の形状は、顕著に異なることが明らかになった(図8)。細胞培養の最初の3時間で、フィブロネクチン有の方は、細胞が完全に伸展したのに対して、フィブロネクチン無のほうは、伸展が限られていた(図9)。アクチンフィラメントの挙動を観察した図9の結果について経時的に観察した結果を勘案すると、固相支持体上に沈着したフィブロネクチンのようなアクチン作用物質がアクチンフィラメントの形状および方向に影響を与え、トランスフェクション効率などの物質の細胞への導入効率を上昇させるものと考えられる。具体的には、フィブロネクチンの存在下では、アクチンフィラメントは、迅速に配置転換し、細胞伸展とともに核の下にある細胞質空間から消失する。フィブロネクチンのようなアクチン作用物質によって誘導される核周辺のアクチン枯渇によって、DNAなどの標的物質が細胞内および必要に応じて核内へ移行すると考えられる。理論に束縛されないが、これは、細胞質の粘性の低下および正に荷電したDNA粒子が負に荷電したアクチンフィラメントに捕捉されることを防止するという効果に起因すると考えられる。また、核の表面積は、フィブロネクチン存在下で顕著に拡大することから(図10)、DNAなどの標的物質の核への移行が容易になるものと考えられる。

## 【0657】

(実施例3: バイオアレイへの応用)

次に、上述の効果がアレイを用いた場合でも実証されるかどうかを確認するために規模拡大して実験を行った。

## 【0658】

(実験プロトコル)

(細胞供給源、培養培地、および培養条件)

この実施例では、5種類の異なる細胞株を使用した: ヒト間葉系幹細胞(hMSC、PT-2501、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)、ヒト胚性腎細胞HEK293(RCB1637、RIKEN Cell Bank, JPN)、NIH3T3-3(RCB0150、RIKEN Cell Bank, JPN)、HeLa(RCB0007、RIKEN Cell Bank, JPN)、およびHepG2(RCB1648、RIKEN Cell Bank, JPN)。ヒトMSC細胞の場合、この細胞を、市販のヒト間葉細胞基底培地(MSCGM BulletKit PT-3001, Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)中で維持した。HEK293細胞、NIH3T3-3細胞、HeLa細胞およびHepG2細胞の場合、これらの細胞を、10% ウシ胎仔血清(FBS、29-167-54、Lot No. 2025F、Dainippon Pharmaceutical CO., LTD., JPN)を有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、L-グルタミンおよびビルビン酸ナトリウムを有する高グルコース(4.5g/L); 14246-25、Nakalai Tesque, JPN)中で維持した。全ての細胞株を、37℃、5% CO<sub>2</sub>に制御されたインキュベーター中で培養した。hMSCを含む実験において、本発明者らは、表現型の変化を回避するために、5継代未満のhMSCを使用した。

## 【0659】

(プラスミドおよびトランスフェクション試薬)

トランスフェクションの効率を評価するために、pEGFP-N1ベクターおよびpDsRed2-N1ベクター(カタログ番号6085-1、6973-1、BD Biosciences Clontech, CA)を使用した。共に遺伝子発現は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの制御下であった。トランスフェクトされた細胞は、それぞれ、連続的にEGFPまたはDsRed2を発現した。プラスミドDNAを、Escherichia coli、XL1-blue株(200249, Stratagene, TX)を使用して増幅し、そしてEndoFree Plasmid Kit (EndoFree Plasmid Maxi Kit 12362, QIAGEN, CA)によって精製した。全ての場合において、プラスミドDNAを、DNaseおよびRNaseを含まない水に溶解した。トランスフェクション試薬は以下のようにして得た: Effectene Transfection Reagent (カタログ番号301425, Qiagen, CA)、TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Promega, WI)、Tfx™-20 Reagent (E2391, Promega, WI)、SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA)、PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA)、LipofectAMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen corporation, CA)、JetPEI (×4) conc. (101-30, Polyplus-transfection, France)、およびExGen 500 (R0511, Fermentas Inc., MD)。

## 【0660】

(固相系トランスフェクションアレイ(SPTA)生成)

「リバーストランスフェクション」についてのプロトコルの詳細は、ウェブサイト [http://staffa.wi.mit.edu/sabatini\\_public/r](http://staffa.wi.mit.edu/sabatini_public/r)

reverse\_transfection.htm の「Reverse Transfection Homepage」に記載されていた。本発明者らの固相系トランスフェクション（SPTA方法）において、疎水性フッ素樹脂コーティングによって分離した48平方パターン（3mm×3mm）を有する3つの型のスライドガラス（シラン処理したスライドガラス；APSスライド、およびポリーレーリジンでコーティングしたスライドガラス；PLLスライド、およびMASでコーティングしたスライド；Matsunami Glass Ind., LTD., JPN）を研究した。

#### 【0661】

（プラスミドDNAプリンティング溶液の調製）

SPTAを生成するための2つの異なる方法を開発した。その主な違いは、プラスミドDNAプリンティング溶液の調製にある。

#### 【0662】

（方法A）

Effectene Transfection Reagentを使用する場合、プリンティング溶液は、プラスミドDNAおよび細胞接着分子（4mg/mLの濃度で超純水に溶解したウシ血漿フィブロネクチン（カタログ番号16042-41、Nakalai Tesque, JPN））を含んだ。上記の溶液を、インクジェットプリンタ（synQUADTM, Cartesian Technologies, Inc., CA）を用いてか、または手で0.5～10μLチップを用いて、スライドの表面に適用した。このプリントしたスライドガラスを安全キャビネットの内側で室温にて15分間かけて乾燥させた。トランスフェクションの前に、総Effectene試薬を、DNAプリントしたスライドガラス上に静かに注ぎ、そして室温にて15分間インキュベートした。過剰のEffectene溶液を、吸引アスピレーターを用いてスライドガラスから除去し、そして安全キャビネットの内側で室温にて15分間かけて乾燥させた。得られたDNAプリントしたスライドガラスを、100mm培養ディッシュの底に置き、そして約25mLの細胞懸濁液（2～4×10<sup>4</sup>細胞/mL）を、このディッシュに静かに注いだ。次いで、このディッシュを37℃、5% CO<sub>2</sub>のインキュベーターに移し、2～3日間インキュベートした。

#### 【0663】

（方法B）

他のトランスフェクション試薬（TransFastTM, TfxTM-20, SuperFect, PolyFect, LipofectAMINE 2000, JetPEI（×4）conc. またはExGen）の場合、プラスミドDNA、フィブロネクチン、およびトランスフェクション試薬を、製造業者が配布する指示書に示される比率に従って1.5mLのマイクロチューブ中で均一に混合し、そしてチップ上にプリンティングする前に室温にて15分間インキュベートした。プリンティング溶液を、インクジェットプリンターまたは0.5～10μLチップを用いてスライドガラスの表面上に適用した。このプリントしたスライドガラスを、安全キャビネットの内側で室温にて10分間かけて完全に乾燥させた。プリントしたスライドガラスを100mm培養ディッシュの底に置き、そして約3mLの細胞懸濁液（2～4×10<sup>4</sup>細胞/mL）を添加し、安全キャビネットの内側で室温にて15分間にわたってインキュベートした。インキュベーション後、新鮮な培地をこのディッシュに静かに注いだ。次いで、このディッシュを37℃、5% CO<sub>2</sub>のインキュベーターに移し、2～3日間インキュベートした。インキュベーション後、本発明者らは、蛍光顕微鏡（IX-71, Olympus PROMARKETING, INC., JPN）を用いて、増強された蛍光タンパク質（EFP, EGFP, およびDsRed2）の発現に基づいてトランスフェクト体を観察した。位相差画像を同じ顕微鏡を用いて撮った。両プロトコルにおいて、細胞をパラホルムアルデヒド（PFA）固定方法（PBS中の4% PFA、処理時間は、室温にて10分間）を用いることによって固定した。

#### 【0664】

(レーザー走査および蛍光強度定量)

トランスフェクション効率を定量するために、本発明者らは、DNAマイクロアレイスキャナ (GeneTAC UC4×4、Genomic Solutions Inc., MI) を使用した。総蛍光強度 (任意の単位) を測定した後、表面積あたりの蛍光強度を計算した。

【0665】

(結果)

(フィブロネクチン支持局所的トランスフェクション)

トランスフェクションアレイチップを、図11に示されるように構築した。トランスフェクションアレイチップは、PLLコーティングされたスライドガラス上でDNA/トランスフェクション試薬およびフィブロネクチンを含む細胞培養液をマイクロプリントすることによって構築した。

【0666】

種々の細胞をこの実施例において用いた。これらの細胞は、通常使用される培養条件で培養した。これらの細胞はスライドガラスに付着することから、細胞は、効率よく取り込まれ、そしてアレイ上に与えられた位置でプリントされたDNAに対応する遺伝子を発現した。通常のトランスフェクション方法 (例えば、カチオン性脂質またはカチオン性高分子媒介トランスフェクション) と比較すると、本発明の方法を用いた場合のトランスフェクション効率は、いずれも顕著に高かった。特に、トランスフェクトすることが困難とされていたHepG2、hMSCなどのような組織幹細胞でも、効率よくトランスフェクトされることが見出されたことは、特に重要である。hMSCの場合には、従来方法の約40倍以上の効率上昇が見られた。また、高密度アレイに必要な高い集積度も達成された (すなわち、アレイ上で隣接するスポット同士の間の夾雑が顕著に減っていた)。これは、EGFPおよびDs-REDのチェック状パターンのアレイを生成することによって確認した。ヒトMSCをこのアレイにおいて培養し、実質的にすべての空間解像度が示されるように対応する蛍光タンパク質を発現させた。その結果図12に示されるように、ほとんど夾雑していないことが明らかになった。プリント混合物の個々の成分の役割に関するこの研究に基づいて、種々の細胞に関して、トランスフェクション効率の最適化を行うことができる。

【0667】

(フィブロネクチンによる局所的トランスフェクションにおける効率化)

本発明者らの上述してきたデータを総合すると、フィブロネクチンなどの接着因子または細胞外マトリクスタンパク質と称されていたタンパク質は、細胞接着活性以外の活性を有することが明らかになった。そのような活性としては、種々の細胞によって異なるが、これらの活性は、トランスフェクション効率の上昇に関与していることがわかる。なぜなら、フィブロネクチンの有無で接着の様子を調べた結果 (図8) によると、接着の状態自体は差異が見られなかったからである。

【0668】

(ヒト間葉系幹細胞の固相系トランスフェクションアレイ)

多様な種類の細胞に分化するヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の能力は、組織再生および組織復活を標的化する研究にとって特に興味深いものになっている。特に、これらの細胞の形質転換についての遺伝子解析は、hMSCの多能性を制御する因子を解明する上で、関心が高まっている。hMSCの研究は、所望の遺伝物質を用いたトランスフェクションが不可能な点にある。

【0669】

これを達成するために、従来の方法は、ウイルスベクターまたはエレクトロポレーションのいずれかの技術を含む。本発明者らが開発した複合体-塩という系を用いることにより、種々の細胞株 (hMSCを含む) に対して高いトランスフェクション効率ならびに密集したアレイ中での空間的な局在の獲得を可能にする固相系トランスフェクションが達成された。固相系トランスフェクションの概略を、図13Aに示す。



## 【0670】

固相系トランスフェクションにより、インビボ遺伝子送達のために使用され得る「トランスフェクションパッチ」の技術的な達成ならびにhMSCにおける高スループットの遺伝子機能研究のための固相系トランスフェクションアレイ（SPTA）が可能になることが判明した。

## 【0671】

哺乳動物細胞をトランスフェクトするための多数の標準的な方法が存在するが、遺伝物質のhMSCへの導入については、HEK293、HeLaなどの細胞株を比較して不便かつ困難であることが知られている。従来使用されるウイルスベクター送達またはエレクトロポレーションのいずれも重要であるが、潜在的な毒性（ウイルス方法）、ゲノムスケールでの高スループット分析を受けにくいこと、およびインビボ研究に対して制限された適用性（エレクトロポレーションに関して）のような不便さが存在する。

## 【0672】

固相支持体に簡便に固定することができ、かつ徐放性および細胞親和性を保持した固相支持体固定系が開発されたことにより、これらの欠点のほとんど克服することができた。

## 【0673】

上述の実験の結果の一例を、図13Bに示す。マイクロプリンティング技術を使用する本発明者らの技術を用いて、選択された遺伝物質、トランスフェクション試薬および適切な細胞接着分子、ならびに塩を含む混合物を、固体支持体上に固定化し得た。混合物を固定化した支持体の上での細胞培養は、その培養細胞に対する、混合物中の遺伝子の取り込みを可能にした。その結果、支持体-接着細胞における、空間的に分離したDNAの取り込みを可能にした（図13B）。

## 【0674】

本実施例の結果、いくつかの重要な効果が達成された：高いトランスフェクション効率（その結果、統計学的に有意な細胞集団が研究され得る）、異なるDNA分子を支持する領域間の低い相互夾雑（その結果、個々の遺伝子の効果が、別々に研究され得る）、トランスフェクト細胞の長期生存、高スループットの互換性のある形式および簡便な検出方法。これらの基準を全て満たすSPTAは、さらなる研究のための適切な基盤となる。

## 【0675】

これらの目的の達成を明確に確立するために、上述のように本発明者らは、5種類の異なる細胞株（HEK293、HeLa、NIH3T3、HepG2およびhMSC）を、本発明者らの方法論（固相系でのトランスフェクション）（図13Aおよび図13Cを参照のこと）および従来の液相系トランスフェクションの両方を用いて一連のトランスフェクション条件下で研究した。SPTAの場合、相互夾雑を評価するために、本発明者らは、チェック模様のパターンでガラス支持体上にプリントした赤色蛍光タンパク質（RFP）および緑色蛍光タンパク質（GFP）を使用し、一方、従来の液相系トランスフェクションを含む実験の場合（ここで、本来、トランスフェクト細胞の自発的な空間的分離は達成され得ない）、本発明者らは、GFPを使用した。いくつかのトランスフェクション試薬を評価した：4つの液体トランスフェクション試薬（Effectene、TransFast™、Tfx™-20、LopofectAMINE 2000）、2つのポリアミン（Superfect、Polyfect）、ならびに2つの型のポリイミン（JetPEI（×4）およびExGen 500）。

## 【0676】

トランスフェクション効率：トランスフェクション効率を、単位面積あたりの総蛍光強度として決定した（図14A。図14Bはそのイメージを示す。）。使用した細胞株に従って、最適な液相の結果を、異なるトランスフェクション試薬を用いて得た（図14C-Dを参照のこと）。次いで、これらの効率的なトランスフェクション試薬を、固相系プロトコルの最適化に使用した。いくつかの傾向が観察された：容易にトランスフェクト可能な細胞株（例えば、HEK293、HeLa、NIH3T3）の場合、固相系プロトコルで観察されたトランスフェクション効率は、標準的な液相系プロトコルと比較してわずか

に優れていたが、本質的に類似したレベルで達成されている(図14)。

#### 【0677】

しかし、細胞をトランスフェクトするのが困難な場合(例えば、hMSCおよびHe p G 2)においてSPTA方法論に最適化した条件を用いることによって、本発明者らは、細胞の特徴を維持しながら、トランスフェクション効率が40倍まで増加したことを観察した(上述のプロトコルおよび図14C-Dを参照のこと)。hMSCの特定の場合(図15)、最良条件は、ポリエチレンジオキシン(PEI)トランスフェクション試薬の使用を含んだ。予想したように、高いトランスフェクション効率を実現するための重要な因子は、ポリマー内の窒素原子(N)の数とプラスミドDNA内のリン酸残基(P)の数との間の電荷バランス(N/P比率)、ならびにDNA濃度である。一般的に、N/P比率および濃度における増大は、トランスフェクション効率の増大を生じる。並行して、本発明者らは、hMSCの溶液トランスフェクション実験における高いDNAおよび高いN/P比率の場合に、細胞生存率の有意な低下を観察した。これら2つの拮抗因子に起因して、hMSCの液相系トランスフェクションの効率は、かなり悪い非常に低い細胞生存率(N/P比率>10で観察された)であった。しかし、SPTAプロトコルは、細胞生存率にも細胞形態にも有意に影響を与えることなく、非常に高い(固体支持体に固定された)N/P比率およびDNA濃度を許容し(おそらく、細胞膜に対する固体支持体の安定化効果に起因する)、従って、このことがおそらく、トランスフェクション効率の劇的な改善の原因となっている。SPTAの場合、10のN/P比率が最適であることが見出され、細胞毒性を最小化しながら十分なトランスフェクションレベルを提供する。SPTAプロトコルにおいて観察されたトランスフェクション効率の増大に関するさらなる理由は、高い局所的なDNA濃度/トランスフェクション試薬濃度(これは、液相系トランスフェクション実験において使用される場合は細胞死を生成する)の達成である。

#### 【0678】

チップ上での高いトランスフェクション効率の達成のための重要な点は、使用されるコーティング剤である。ガラス製のチップを用いた場合、PLLが、トランスフェクション効率および相互夾雑の両方に関して、最良の結果を提供することを発見した(下記に考察する)。フィブロネクチンコーティングしない場合、少数のトランスフェクト体を観察した(他のすべての実験条件は一定に保った)。完全に確立したわけではないが、フィブロネクチンの役割はおそらく、細胞接着プロセスを加速し(データは示していない)、ゆえに、表面を離れたDNA拡散が可能になる時間を制限するということである。

#### 【0679】

低い相互夾雑: SPTAプロトコルで観察されたより高いトランスフェクション効率は別として、本技術の重要な利点は、別個に分離された細胞アレイの実現であり、その各位置では、選択した遺伝子が発現する。本発明者らは、フィブロネクチンでコーティングしたガラス表面上に、Jet PEI(「実験プロトコル」を参照のこと)およびフィブロネクチンと混合した2つの異なるレポーター遺伝子(RFPおよびGFP)をプリントした。得られたトランスフェクションチップを適切な細胞培養に提供した。最良であるとして見出された実験条件下において、発現されたGFPおよびRFPは、それぞれのcDNAがスポットされた領域に局在した。相互夾雑はほとんど観察されなかった(図16)。しかし、フィブロネクチンまたはPLLの非存在下において、固相でのトランスフェクションの障害となる相互夾雑が観察され、そしてトランスフェクション効率は、有意に低かった(図6を参照)。このことは、細胞接着および支持体表面から離れて拡散するプラスミドDNAの相対的な割合が、高いトランスフェクション効率および高い相互夾雑の両方に対して重要な因子であるという仮説を立証する。

#### 【0680】

相互夾雑のさらなる原因は、固体支持体上のトランスフェクション細胞の移動性であり得る。本発明者らは、数個の支持体上での細胞接着速度(図16C)およびプラスミドDNAの拡散速度の両方を測定した。その結果、最適条件下においてDNA拡散はほとんど生じなかった。しかし、高い相互夾雑条件下において、細胞接着が完了するまでの時間に

、相当な量のプラスミドDNAが拡散し、その結果、固相表面からプラスミドDNAが涸渇した。

#### 【0681】

この確立された技術は、経済的な高スループットの遺伝子機能スクリーニングの状況において特に重要である。実際に、必要とされる少量のトランスフェクション試薬およびDNA、ならびに全プロセス（プラスミドの単離から検出まで）を自動化する可能性は、上記の方法の有用性を増大する。

#### 【0682】

結論として、本発明者らは、複合体一塩を用いた系で、hMSCトランスフェクションアレイを好首尾に実現した。このことは、多能性幹細胞の分化を制御する遺伝子機構の解明など、固相系トランスフェクションを利用した種々の研究における高スループット研究を可能にすることになる。固相系トランスフェクションの詳細な機構ならびに高スループットのリアルタイム遺伝子発現モニタリングに対するこの技術の使用に関する方法論は種々の目的に応用可能であることが明らかになった。

#### 【0683】

（実施例4：数理解析）

次に、実施例2の手法を用いて得られたデータをもとにプロファイルを生成した。

#### 【0684】

（分化誘導）

各レポーターを固相支持体に固定し、未分化の間葉系幹細胞の維持培地（MSCGM、PT-3001、PT-3238、PT-4105、Cambrex、BioWhittaker, USA）において2日間培養後、分化誘導培地（hMSC Differentiation、PT-3002、PT-4120、Cambrex、BioWhittaker, USA）に培地を換え、各レポーターの応答プロファイルを測定した。

#### 【0685】

（数理解析法）

使用した数理解析法を図18（図18A-B（18-1～18-2））に示す。

#### 【0686】

（使用した転写因子）

図19および図24に示すように、17種類の転写因子（ISRE、RARE、STAT3、GAS、NFAT、MIC、AP1、SRE、GRE、CRE、NFκB、ERE、TRE、E2F、Rb、p53）を、GFPに作動可能に連結したプラスミド（Clontechから市販される）を用いて、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を観察した。このとき得られたプロファイルを図19に示す。また、転写因子レポーターの構築は、図23に示されるように行った。

#### 【0687】

転写因子のレポーターのアッセイを行った。これはClontechにより公開されているコントロール条件（細胞、添加因子、培養条件など）にしたがって行った。

#### 【0688】

その結果を図25に示す。このようにDNAのみと比較した場合、ほとんどの転写因子において誘導因子を添加したときに誘導がかかることが実証された。

#### 【0689】

次に、骨分化誘導の際の転写因子活性の時系列的測定を行った。これは上述の条件に従って、分化誘導させたときにプロファイルと比較したものである。プロファイルは、各レポーター遺伝子を固相系トランスフェクション法を用いて導入し、2日間未分化維持培地にて培養を行い、骨芽細胞分化誘導培地と交換した。この時点を骨芽細胞分化開始時間とした。添加因子などに関しては、骨芽細胞分化誘導培地に推奨の濃度にて行った。その他の培養に関しては、Cambrex社の指示書通りに行った。

#### 【0690】

結果を図26に示す。培地交換後10時間～30時間では、図26に左のようなプロフ

ファイルパターンを示していたのに対し、培地交換後5～6日では、右のようなプロファイルパターンを示し、顕著に変動していることが明らかになった。これを、図27に示される式を用いて、位相を算出し、その結果を図27の右の表にまとめた。このように、分化に特に深い関係がある、ISRE、RARE、STAT3、GRE、CRE、TRE、E2F、およびp53において、位相の反転が見られた。従って、位相を判定することは、プロセスの変化が起こる、つまり、転写制御が起こっていると判定することができることが明らかになった。

#### 【0691】

(プロモーターの任意性)

次に、分化誘導初期において任意に抽出される組み合わせを変化させるときの同定可能性を実証した。解析は図20に示されるように行った。

#### 【0692】

この結果を図20に示す。この解析により、分化のごく初期に関しては、分化誘導を把握できない(他のノイズもあると考えられる)が、約15時間後以降では、確認することが可能であることが判明した。変化を同定することができるのが100%となったのは、本実施例では8以上であったが、抽出数が3のときでもすでに90%を超える同定率を示しており、2のときでも88%、1のときでも82%を示していることから、1つでも、2つでも、あるいは少なくとも3つでも、細胞の状態を判定または同定するのに充分であることが明らかになった。

#### 【0693】

(未分化維持)

次に、未分化維持に関して、任意に抽出される組み合わせを変化させて解析した。解析は図20に記載されるものに準じて行った。

#### 【0694】

この結果を図21に示す。分化誘導時の結果と比べると大きく異なり、この比較によって、本実施例での処理により、幹細胞が分化誘導に向かっているのか未分化を未分化を維持しているのかが判断することができる。このような判断は、少なくとも1つの生物学的因子を用いることによって行うことができた。このように少ない数でも十分に細胞の状態を判定することができることは、従来技術では達成できなかったことであり、本発明は、優れた効果を達成したということができる。

#### 【0695】

このようにプロセスを解析することによって、図22に示すように、細胞機能の形成は、種々の因子のカクテルパーティープロセスとして記述することが可能であることがわかる。このようなプロセス記述により、本発明は、薬剤応答プロセスおよび分化誘導プロセスの解析を行うことを可能にした。

#### 【0696】

(実施例5: 抗がん剤)

本実施例では、シスプラチンを抗がん剤の例として、培地に混ぜ、細胞に曝露した。用いた濃度としては、1  $\mu$ M、5  $\mu$ M、10  $\mu$ Mなどを適宜採用して細胞の反応を見た。シスプラチンに耐性の細胞および感受性の細胞に対してシスプラチンを適用し、上述の実施例と同様にしてプロファイルを観察した。その結果、シスプラチンの濃度および耐性/感受性の違いにより、顕著にプロファイルが変動することが明らかになった。

#### 【0697】

(実施例6: RNAi)

実施例1に記載されるように細胞を固定し、生物学的因子としてRNAiを用いて遺伝子ノックダウン効果に関するプロファイルを取得することができることを実証した。RNAiとして以下のものを用いて、以下の実験を行った。リボザイム、siRNAなどの遺伝子発現抑制法を用いて遺伝子発現抑制を行った細胞における応答反応をプロフィールとして得ることが可能である。

## 【0698】

RNAi: <http://www.nippongene.jp/pages/products/sirna/review/>において入手可能な配列 (例えば、Controlsirna duplex) を使用した。

## 【0699】

(RNAiのトランスフェクション)

siRNAがまず、ノックダウンし得るかどうかを確認した。EGFPに対する5'-AA GCAGCAGGACUUCUUAAG-3' siRNA (配列番号12) を合成し、これを上述の実施例に記載されるようにアレイ基板を調製した。ここでは、プロモーター配列を含む核酸分子の代わりにsiRNAを用いてアレイ基板を調製した。このアレイ基板を用いてトランスフェクトすると、標的遺伝子の発現が効果的に抑制されるかどうかを確認した。そのプロトコルは、図28に示される。

## 【0700】

(結果)

siRNAによる標的遺伝子抑制の効果を示す結果を図29に示す。実際に標的遺伝子の発現が効果的に抑制された。このゲルでの結果は、任意のデータ形式でプロファイルとして格納することができる。

## 【0701】

次に、siRNAでの結果をプロファイルデータとして保存する。(5 $\mu$ m/pixel以下の解像度有するTIFFフォーマットの画像データ)。このようにsiRNAでの結果は、プロファイルデータとして保存できる。そのような形式は、この実施例で示した形式に限定されず、当業者は任意の形式を用いることができる。

## 【0702】

(実施例7: テトラサイクリン依存性プロモーターを用いた遺伝子発現調節)

実施例1~3に記載の実施例と同様に、テトラサイクリン依存性プロモーターを用いて遺伝子発現調節がどのようになされるかをプロファイルとして生成することができることを実証した。使用した配列は以下のとおりである。

## 【0703】

テトラサイクリン依存性プロモーター (およびその遺伝子ベクター構築物) としては、BD BiosciencesのpTet offおよびpTet onベクター系を用いた (<http://www.clontech.com/techinfo/vectors/cattet.shtml>を参照)。ベクターは、pTRE-d2EGFPを利用した (<http://www.clontech.com/techinfo/vectors/vectorsT-Z/pTRE-d2EGFP.shtml>に記載されている)。

## 【0704】

(プロトコル)

アレイ基板上に、テトラサイクリン依存性プロモーターと、非依存性プロモーター (配列をご教示ください) とをプリントし、同一基板上においてテトラサイクリンによる遺伝子発現調節がされるかどうかをリアルタイムで計測した。その結果を、図30に示す。図30に示されるように、依存性プロモーターでのみ遺伝子発現の変化が測定された。図31には、非依存性と依存性における発現の実際の様子を写真として示す。このように、肉眼でもはっきりわかる程度に比較可能に変化が測定可能となる。

## 【0705】

(プロファイルデータの測定)

リアルタイムに取得した画像をもとにして、細胞あたり、面積あたりの輝度変化をグラフ化し、ノイズ除去などの一次変換の後、多変量解析、信号処理法などを適用し、プロファイルデータを提示することができた。これを現象ごと、細胞ごとに比較することで、細胞特有の応答や同一性を取得することができた。

## 【0706】

(実施例7: 遺伝子発現)

次に、構造遺伝子をコードする核酸分子を用いて細胞のプロファイルを作成した。ここでは、構造遺伝子として、嗅覚レセプターI7 (配列番号13、14) を使用した。プロ

トコルは、実施例 1～3 に準じた。

【0707】

その結果、プロモーターと同様に、遺伝子産物の量などを測定することで、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

【0708】

(実施例 8: アポトーシスシグナル)

次に、細胞内にあるカスパーゼ 3 の活性化に着目してモニターしても、細胞のプロファイルを作成することができることを調べた。トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

【0709】

ここでは、pCaspase3-Sensor Vector (BD Biosciences Clontech, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303; カタログ番号 8185-1) を用いて、アポトーシスシグナルであるカスパーゼ 3 をモニターした。

【0710】

その結果、プロモーターと同様に、アポトーシスシグナルなどを測定することで、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

【0711】

(実施例 9: ストレスシグナル)

次に、細胞内にある JNK、ERK、p38 などのアポトーシスシグナルを転写因子レポーターを使用してストレスシグナルに関し細胞のプロファイルを作成することができることを調べた。トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

【0712】

ここでは、BD Bioscience Clontech から入手した pAP1-EGFP、pCRE-EGFP、pSRE-EGFP を用いて、ストレスシグナルである JNK、ERK、p38 をモニターした。

【0713】

その結果上述の実施例と同様に、ストレスシグナルなどを測定することで、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

【0714】

(実施例 10: 分子局在化)

次に、蛍光タンパク質を目的遺伝子に融合させ、その発現プロファイルおよび細胞内における局在化を可視化することができることを実証した。

【0715】

ここでは、蛍光タンパク質として、GFP、RFP、CFP、BFP を使用し、目的遺伝子として、KIAA クローン、cDNA ライブラリーなどを使用し、これらを用いて遺伝子構築物を作製した。具体的に使用したものは以下のとおりである。

【0716】

KIAAcDNA クローン (KIAA = かずさ DNA 研究所、かずさ、千葉から入手可能)

インビトロジェンの cDNA 市販ライブラリー

トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

【0717】

ここでは、KIAA クローンの内の KIAA1474 を用いて、発現プロファイルおよび局在化をモニターした。

【0718】

その結果上述の実施例と同様に、意図的に構築した遺伝子構築物を用いて、意図したパラメータについて、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

【0719】

(実施例 11: 細胞形態変化)

次に、ある遺伝子を発現させて、あるいは、ノックダウンし、あるいは、添加物質 (ここでは、化学物質としてグリセロフォスフェートを使用し、サイトカインとしてデキサメ

タゾンを使用する)細胞形態の変化をプロファイルとして取得することができることを実証した。細胞形態としては、細胞の多核化、伸展状態、伸展突起の伸長などを、三次元データとして取得し、解析した。

【0720】

ここでは、導入した核酸分子の具体的な配列は以下のとおりである。

【0721】

KIAAクローン (前出)

転写因子に対するRNAi (CBFA-1, AP1)。

【0722】

トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

【0723】

ここでは、上述の実施例で用いた間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞分化誘導した際の細胞形態をモニターした。

【0724】

その結果上述の実施例と同様に、意図的に構築した遺伝子構築物を用いて、意図したパラメータについて、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

【0725】

(実施例12：分子間相互作用)

次に、ツーハイブリッドシステム、FRET、BRETなどの手法を用いて細胞のプロファイルを取得することができることを実証した。

【0726】

ここでは、導入した核酸分子の具体的な配列は以下のとおりである。

【0727】

嗅覚レセプター (配列番号13～38に示す配列をもつもの) とGタンパク質 (配列番号39～44に示す配列をもつもの)

トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

【0728】

ここでは、嗅覚レセプターとGタンパク質の解離を臭い物質の誘導によってモニターし、これを蛍光波長の変化として用いて、細胞をモニターした。

【0729】

ここで使用したツーハイブリッドシステム、FRETおよびBRETは、具体的には以下のようにして行った。

【0730】

ツーハイブリッドシステム (Clontechから入手; <http://www.clontech.co.jp/product/catalog/007003006.shtml>)。FRETおよびBRETは、ペルトールドジャパンから入手可能な機器を用いて測定した。

【0731】

その結果上述の実施例と同様に、意図的に構築した遺伝子構築物を用いて、ツーハイブリッドシステム、FRET、BRETなどによっても、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

【0732】

(実施例13：レセプターーリガンド)

次に、レセプターとリガンドとの相互作用を指標に細胞のプロファイルを取得することができることを実証した。細胞膜、核膜などに存在するレセプタータンパク質とリガンドとの相互作用情報を取得することは、細胞内のネットワーク形成に有用である。

【0733】

この実施例において調製したものは以下のとおりである。

【0734】

(細胞接着因子)

細胞接着分子の候補として、種々の細胞外マトリクスタンパク質およびその改変体もし



くはそのフラグメントを準備した。この実施例において調製したものは以下のとおりである。細胞接着因子などは、市販のものを用いた。

- 1) プロネクチンF (三洋化成、京都、日本) ;
- 2) プロネクチンL (三洋化成) ;
- 3) プロネクチンPlus (三洋化成) ;
- 4) フィブロネクチン (配列番号2)
- 5) ゼラチン。

#### 【0735】

DNAとしてトランスフェクションのためのプラスミドを調製した。プラスミドとして、pEGFP-N1およびpDsRed2-N1(ともにBD Biosciences, Clontech, CA, USA)を用いた。EGFの配列は、配列番号45-46に示される。これらのプラスミドでは、遺伝子発現はサイトメガロウイルス(CMV)の制御下にある。プラスミドDNAを、E. coli(XL1blue, Stratgene, TX, USA)中で増幅し増幅したプラスミドDNAを複合体パートナーの一方として用いた。DNAは、DNaseもRNaseも含まない蒸留水中に溶解した。

#### 【0736】

使用したトランスフェクション試薬は以下の通りである：Effectene Transfection Reagent(cat.no.301425, Qiagen, CA), TransFast™ Transfection Reagent(E2431, Promega, WI), Tfx™-20 Reagent(E2391, Promega, WI), SuperFect Transfection Reagent(301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection Reagent(301105, Qiagen, CA), LipofectAMINE 2000 Reagent(11668-019, Invitrogen corporation, CA), JetPEI(×4)conc.(101-30, Polyplus-transfection, France)およびExGen 500(R0511, Fermentas Inc., MD)。トランスフェクション試薬は、上記DNAおよび細胞接着分子にあらかじめ加えるかあるいはDNAと複合体を先に生成してから使用した。

#### 【0737】

このようにして調製した溶液を以下のトランスフェクションアレイ作製に用いた。次に固相におけるトランスフェクション効果を観察した。そのプロトコルを以下に示す。

#### 【0738】

(プロトコル)

DNAの最終濃度は、 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した。細胞接着分子は、ddH<sub>2</sub>O中で $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のストックとして保存した。全ての希釈をPBS、ddH<sub>2</sub>OまたはDMEM培地を用いて行った。希釈系列として、例えば、 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.27\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.53\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.8\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.07\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.33\mu\text{g}/\mu\text{L}$ などを調製した。

#### 【0739】

トランスフェクション試薬は、それぞれの製造業者が提供する指示書に従って、使用した。

#### 【0740】

プラスミドDNA：グリセロールストックから100mLのLamp中で一晩増殖させ、Qiaprep MiniprepまたはQiagen Plasmid Purification Maxiを用いて製造業者が提供する標準プロトコルによって精製した。

#### 【0741】

本実施例では、以下の5種類の細胞を利用して、効果を確認した：ヒト間葉系幹細胞(hMSCs, PT-2501, Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)、ヒト胚性腎細胞(HEK 293, RCB1637, RIKEN Cell Bank, JPN)、NIH3T3-3細胞(RCB0150, RIKEN Cell Bank, JPN)、HeLa細胞(RCB0007, RIKEN Cell Bank, JPN)およびHepG2(RCB1648, RIKEN Cell Bank, JPN)。これらは、L-glutおよびpen/strepを含むDMEM/10%IFS中で培養した。

#### 【0742】

(希釈およびDNAのスポット)

トランスフェクション試薬とDNAとを混合してDNA-トランスフェクション試薬複合体を形成させる。複合体形成にはある程度の時間が必要であることから、上記混合物を、アレイ作製機(arrayer)を用いて固相支持体(例えば、ポリ-L-リジンスラ

イド) にスポットした。本実施例では、固相支持体として、ポリ-L-リジンスライドのほか、APSスライド、MASスライド、コーティングなしのスライドを用いた。これらは、松浪硝子(岸和田、日本) などから入手可能である。

#### 【0743】

複合体形成およびスポット固定のために、真空乾燥機中で一晚スライドを乾燥させた。乾燥時間の範囲は、2時間から1週間とした。

#### 【0744】

細胞接着分子は、上記複合体形成時に使用してもよいが、本実施例では、スポットティングの直前に使用する形態も試験した。

#### 【0745】

(混合液の調製および固相支持体への適用)

エッペンドルフチューブに、300  $\mu$ LのDNA濃縮緩衝液(EC緩衝液)+16  $\mu$ Lのエンハンサーを混合した。これをボルテックスによって混合し、5分間インキュベートした。50  $\mu$ Lのトランスフェクション試薬(Effectedeneなど)を加え、そしてピペティングによって混合した。トランスフェクション試薬を適用するために、スライドのスポットのまわりにワックス環状バリアーを引いた。スポットのワックスで囲まれた領域に366  $\mu$ Lの混合物を加え、室温で10から20分間インキュベートした。これにより、支持体への手動による固定が達成された。

#### 【0746】

(細胞の分配)

次に、細胞を添加するプロトコルを示す。トランスフェクトのために細胞を分配した。この分配は、通常、フード内で試薬を減圧吸引して行った。スライドを皿に置き、そしてトランスフェクションのために細胞を含む溶液を加えた。細胞の分配は、以下のとおりである。

#### 【0747】

細胞の濃度が25 mL中 $10^7$ 細胞になるように、増殖中の細胞を分配した。四角の100×100×15 mmのペトリ皿または半径100 mm×15 mmの円形ディッシュ中で、スライド上に細胞をプレーティングした。約40時間、トランスフェクションを進行させた。これは、約2細胞周期にあたる。免疫蛍光のためにスライドを処理した。

#### 【0748】

(遺伝子導入の評価)

遺伝子導入の評価は、例えば、免疫蛍光、蛍光顕微鏡検査、レーザー走査、またはエマルジョンを用いた検出によって達成した。

#### 【0749】

可視化されるべき発現されたタンパク質が蛍光タンパク質であるなら、それらを蛍光顕微鏡検査で見てもそして写真を撮ることができる。大きな発現アレイに関しては、スライドをデータ保存のためにレーザースキャナーで走査し得る。あるいは、カルシウムの場合のように、特異的な蛍光で検出可能な場合は、その蛍光を検出することによってシグナルを検出することができる。発現されたタンパク質を蛍光抗体が検出し得るなら、免疫蛍光のプロトコルを引き続いて行うことができる。

#### 【0750】

(レーザー走査および蛍光強度定量)

トランスフェクション効率を定量するために、本発明者らは、DNAマイクロアレイスキャナ(GeneTAC UC4×4, Genomic Solutions Inc., MI)を使用した。総蛍光強度(任意の単位)を測定した後、表面積あたりの蛍光強度を計算した。

#### 【0751】

(共焦点顕微鏡による切片観察)

使用した細胞を、組織培養ディッシュに最終濃度 $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルで播種し、適切な培地を用いて(ヒト間葉系細胞の場合ヒト間葉系細胞基本培地(MSCGM, BulletKit P

T-3001、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD, USA)を用いた) 培養した。細胞層を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、染色試薬であるSYTOおよびTexas Red-Xファロイジン(Molecular Probes Inc., OR, USA)を細胞層に添加して、核およびFアクチンを観察する。遺伝子産物によって発色するサンプルまたは染色されたサンプルを共焦点レーザー顕微鏡(LSM510、CarlZeiss Co., Ltd、ピンホールサイズ=Ch1=123 $\mu$ m、Ch2=108 $\mu$ m; 画像間隔=0.4)を用いて、切片像を得る。

#### 【0752】

次に、嗅覚レセプターをレセプターリガンドの相互作用の観察のための資料として、本発明のセンサに応用した実施例を示す。予備的実験を行ったところ、嗅覚レセプターでもトランスフェクションアレイを用いることが可能であることが判明した。嗅覚レセプター発現ベクター群をレセプター種毎にスポットし、アレイ状にしたカバーガラスを信号測定用チャンバーにネジなどで固定し、その上に性質がほぼ均一な細胞を培養しておいた。信号測定用チャンバーは、公知の構造(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96(1999): 4040-4045など)にサンプルガスを導入した。その他の工夫をしたものもまた企図される。応答測定中は培養液を一定の速度で流しておいた。培養液が培養液供給チューブの開口から測定用チャンバーに供給され、測定部天井用カバーガラス上への培養液の進入を防止する壁に達するまでの区間の上部のなるべく液面に近い位置に、サンプルガスがこの区間を流れる培養液に吹き付けられるようにサンプルガス供給チューブを固定しておいた。このサンプルガス供給チューブはテフロン(登録商標)、ピークなど親油性の匂い物質、埃の吸着しにくい材料で作られていることが好ましかった。また、サンプルガスを導入するとき以外の時間は、チューブ内の残留サンプルガスを除去し、内部をなるべく清浄に保つために、途中に3方弁あるいは無臭空気供給チューブとの接続部での無臭空気供給チューブ側に逆止弁などを設けて無臭空気ですべてのチューブのなるべく広範な長さを洗浄できるようにしておく効果が高かったが、必要というわけではなかった。サンプルガスを0.5~4秒間の適当な時間だけ外部から導入するとき以外は、外部のガス採取開口に近いサンプルガス供給チューブの途中から無臭空気を導入し、チューブ内を洗浄する一方でサンプルガスと同様に培養液に吹き付け、測定チャンバー内の残留ガスの排除を促進するようにしても実施され得た。天井用カバーガラス支持用ベースはテフロン(登録商標)など撥水製の不透明プラスチックで作成する。培養液の流れる流路幅は、アレイの幅の2倍程度とし、その中心にアレイが配置されるようにしておく。培養液供給チューブおよびオーバーフロー培養液吸引チューブは、測定チャンバー側の開口部から数ミリの長さ分はステンレスなど親水性が高く変形しにくい材料を用いる。両者のチューブの開口部からアレイ側に向けて、培養液が流れる天井用カバーガラス支持用ベース上の部分は親水性を十分に持たせるために、コーティングをするかレンズペーパー片などを固定した。吸引のための陰圧は、培養液の吸い込みにより生じる音による振動が測定に影響を与えない程度に調整しておいた。

一般的にベクターにより導入された遺伝子が発現する2日後には応答の測定が可能であった。天井用カバーガラスは測定時にのみ必要になるため、遺伝子を発現させるまでの培養中は設置不要であり、遺伝子が発現し蛍光変化計測系に測定用チャンバーを設置する際に、培養液進入防止壁と一体化させた天井用カバーガラス、天井用カバーガラス支持用ベースを測定用チャンバーに付加しても実施し得た。また、同遺伝子を発現させるまでの培養中は、培養液供給チューブとオーバーフロー培養液吸引チューブを用いずに培養液を交換しても実施し得た。培養液は、応答計測を行わず培養のみしている期間は、数時間~1日に1回程度の頻度で培養液の10ml程度の分量が供給され交換されるようにした。

匂い応答の大きさは、細胞にカルシウムイオン感受性蛍光色素fura-2などを取り込ませておき、高感度ビデオカメラなど2次元撮像素子を用いることで光学的に計測することが可能であった。測定間隔は1/3秒~1秒程度で応答の立ち上がりと回復の時定数を評価できる時間分解能を持たせることが望ましいが、平均的な応答時間曲線あるいはその理論式が得られている場合は、刺激後5秒、10秒、15秒、20秒、25秒の5秒間隔の5点での計測結果

から実際の変化を推定し、得られる応答開始時期、応答立ち上がり・回復の時定数の推定値を指標として信号が匂いにより引き起こされたものか細胞の自発的活動あるいは他の異常により生じているものかなどを評価することもできた。このような評価は、すべて、細胞のプロファイルとして取得することが可能であった。

#### 【0753】

本実施例では、具体的なパラメータとして、嗅覚受容細胞(olfactory receptor neuron)において、発現している嗅覚レセプターの応答をカルシウム感受性蛍光色素の蛍光強度変化の測定により調べた。蛍光強度の減少が嗅覚レセプターの応答に対応する。刺激源として、図中に示した略号の匂い分子をその上に示した濃度で培養液に加えて、バーで示す時間だけ(4秒間あるいは2秒間)細胞に投与した。この例からも分かるように、同時に調製された細胞で同時に測定された応答では、応答の時間特性、細胞毎の異なる刺激に対する応答閾値濃度および応答振幅の相対値の共通性が高いが、異なる時期に調整された細胞では、多少の相違が見られた。これらの結果は、調整条件を同じにし、サンプルガスが均一に投与されるサイズにアレイ化したセンサによって匂い応答を計測することによって、最も測定の信頼性を高めることが可能になることを示している。

#### 【0754】

このように、本発明において、嗅覚レセプターリガンド(嗅覚物質)を用いても、細胞のプロファイルを取得することができることがわかった。

#### 【0755】

(実施例14: データ生成)

実施例5~13において生成したデータは、実施例4に記載したのと同様に、適宜改変を加えた数理解析を用いて解析することができる。そのようなデータは、種々の形態をもって提示することができることが実証された。

#### 【0756】

(実施例15: デジタル細胞の生成)

実施例5~13において生成したデータおよびこれらの実施例に記載されるプロトコルを用いて生成した追加データを用いて、デジタル細胞を生成した。デジタル細胞を生成するために、これらの実施例で生成したデータのためのパラメータを抽出し、まず環境パラメータとして、培地、pH、温度、CO<sub>2</sub>濃度などでデータ整理する。データベース作成は、例えば、Microsoftから発売されるExcelのような表作成ソフトウェアまたはAccessなどのデータベースソフトウェアを用いて作成することができる。次に、細胞パラメータとして、実施例5~13において使用した細胞種を含むデータベースを作成することができる。これに、種々の刺激パラメータ(種々の化学刺激(例えば、HGF、FGF、PDGF、VEGF、CSFなどの種々の増殖因子またはサイトカイン)を含む)を入力し、刺激応答結果を、細胞動態データ、レポーターの計測データ(例えば、蛍光強度など)として入力することができる。これにより、デジタル細胞を構成するデータベースが作成される。その例は、図33A、図33Bに示される。

#### 【0757】

(実施例16: デジタル細胞の利用ーインシリコ生実験)

実施例15において作成したデジタル細胞を用いて、コンピュータ上で実験を行う。本実施例では、間葉系幹細胞を用いてどのような因子が分化因子であるかどうかを検討する。図33Aを例にとれば、細胞は細胞A(ここでは、例えば、間葉系幹細胞など)を選択する。これに対して、培地として、DMEMを選択し、pHは7.4を選択し、温度として37℃を選択し、CO<sub>2</sub>濃度として5%を選択する。これに対して、種々の化学刺激(例えば、HGF、FGF、PDGF、VEGF、CSFなどの種々の増殖因子またはサイトカイン)を選択する。種々の化学刺激については、濃度も適宜(例えば、1nM~1mM)選択する。種々の化学刺激には、それらの2つおよび3つの組合せも選択しておく。これらの組合せおよび濃度に応じて、間葉系幹細胞がどのように応答するかについてデータ出力する。出力データとしては、細胞動態データを含める。細胞動態データから、間葉系幹細胞が分化(例えば、骨髄細胞、脂肪細胞など)するかどうかを確認する。形状で足

りない場合は、さらに、レポーターとして転写因子と EGF との組合せを用いてさらに計測データを出力させる。これにより、間葉系幹細胞がどの分化細胞に分化したかを確認する。これにより、分化細胞へと分化させる化学刺激を特定することができる。

#### 【0758】

(実施例 17：デジタル細胞の利用ーインシリコ生実験による教育)

実施例 16 に記載されるようなインシリコ生実験を、今度は、学校教育において実施する。今度は、上述のような実験テーマを学生に与える。学生は、与えられたデジタル細胞のデータベースから種々のパラメータを選択する。選択したデータをもとに、学生は、自分なりの研究を組み立てる。組み立てられた研究成果は、学生が課題として提出する。これにより、学生を生の実験系を使用せずに教育することができる。

#### 【0759】

(実施例 18：デジタル細胞のサービスとしての提供)

デジタル細胞のデータベースは、外部サービスとして、提供することができる。実施例 15 において生成したデータベースは、例えば、図 35 に示されるものを利用することができる。ここでは、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコンピュータシステム 3501 の構成が示される。コンピュータシステム 3501 は、ユーザが所望するサービスをリクエストするサービスリクエスト 3510 と、そのリクエストに回答して所定のサービスを提供するサービスプロバイダ 3520 とを含む。ユーザーとして、例えば、研究機関または学校教育機関が、要求するサービスをリクエストする。商用サービスを展開するサービスリクエストは、要求に応じて、適切にデータを研究機関または学校教育機関に提供する。学校教育目的などでは、例えば、ある特定の細胞、パラメータなどの特定のデータベースのみをサービス対象としてもよい。

#### 【0760】

このように、本発明のデジタル細胞を用いてサービスを提供することが実証される。

#### 【0761】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0762】

本発明により、驚くべきほど少ない因子を観察することによって、細胞の状態を判定することが可能になった。このような判定により、診断、予防、治療に応用することが可能となり、その応用範囲は医療のみならず、食品、化粧品、農業、環境など種々の分野に及ぶ。コンピュータ上で生実験を再現できることから、バイオテクノロジーにおける教育および研究を行うことができるようになったという産業上の有用性も有する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0763】

【図 1】 図 1 は、HEK293 細胞を用いた場合の種々のアクチン作用物質およびコントロールとしてのゼラチンを用いた結果の一例を示す。

【図 2】 図 2 は、フィブロネクチンのフラグメントを用いた場合のトランスフェクション効率の結果の一例を示す。

【図 3】 図 3 は、フィブロネクチンのフラグメントを用いた場合のトランスフェクション効率の結果の一例を示す。

【図 4】 図 4 は、図 2 および図 3 からまとめたフィブロネクチンのフラグメントを用いた場合のトランスフェクション効率の結果の一例を示す。

【図 5】 図 5 は、種々の細胞におけるトランスフェクション効率を調べた結果の一例を示す。

【図 6】 図 6 は、種々のプレートを用いた場合のトランスフェクションの状態を示す

結果の一例を示す。

【図 7】図 7 は、フィブロネクチンの濃度を 0、0.27、0.53、0.8、1.07 および 1.33（それぞれ  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）として種々のプレート上でトランスフェクションを行った場合の結果を示す。

【図 8】図 8 は、フィブロネクチンの有無での、細胞接着プロファイルを示す写真の一例を示す。

【図 9】図 9 は、フィブロネクチンの有無での、細胞接着プロファイルを示す切片写真の一例を示す。

【図 10】図 10 は、核の表面積の推移を示す。

【図 11】図 11 は、トランスフェクションアレイチップとして構築した場合のトランスフェクション実験の結果の一例を示す。

【図 12】図 12 は、アレイ上での各スポット間の夾雑の様子を示す一例である。

【図 13】図 13 は、実施例 4 における本発明の固相トランスフェクションによって、空間的に分離した DNA の細胞内への取り込みを示す図である。図 13 A は、固相トランスフェクションアレイ（SPTA）作製方法を模式的に示した図である。この図は、固相トランスフェクションの方法論を示す。図 13 B は、固相トランスフェクションの結果を示す。HEK293 細胞株を用いて SPTA を作製した結果を示す。緑色の部分は、トランスフェクションされた付着細胞を示す。この結果から、本発明の方法によって、空間的に分離された、異なる遺伝子によってトランスフェクトされた細胞の集団を調製することが可能となった。

【図 13 C】図 13 C は、固相系でのトランスフェクションの方法論を示す。

【図 14】図 14 A および図 14 B は、液相トランスフェクションと SPTA の比較を示す結果である。図 14 A は、実験に用いた 5 つの細胞株について、GFP 強度/ $\text{mm}^2$  を測定した結果を示す。図 14 A は、トランスフェクション効率を、単位面積あたりの総蛍光強度として決定する方法を示す。図 14 B は、図 14 A の示すデータに対応する、EGFP を発現する細胞の蛍光画像である。図 14 B において、白丸で示された領域は、プラスミド DNA を固定化した領域を示す。プラスミド DNA を固定化した領域以外の領域では、細胞が固相に固定化されたにもかかわらず、EGFP を発現する細胞は観察されなかった。白棒は、 $500\mu\text{m}$  を示す。

【図 14 C】図 14 C は、本発明のトランスフェクション法の一例を示す。

【図 14 D】図 14 D は、本発明のトランスフェクション法の一例を示す。

【図 15】図 15 は、チップのコーティングによって相互夾雑が低減された結果を示す。図 15 は、HEK293 細胞、HeLa 細胞、NIT3T3 細胞（「3T3」として示す）、HepG2 細胞、および hMSC を用いて、液相トランスフェクション法および SPTA を行った結果を示す。トランスフェクション効率を、GFP 強度で示す。

【図 16】図 16 は、各スポット間の相互夾雑に関する様子を示す図である。APS または PLL（ポリ-L-リジン）でコーティングしたチップに対して、所定の濃度のフィブロネクチンを含む核酸混合物を固定化し、その固定化したチップを用いて細胞トランスフェクションした結果、相互夾雑は観察されなかった（上段および中断）。これに対して、チップをコーティングしなかった場合、固定化核酸の有意な相互夾雑が観察された（下段）。

【図 16 C】図 16 C は、核酸の固定化において使用する混合物中に使用される物質の種類と、細胞接着速度との相関関係を示す。このグラフは、時間経過に伴う、接着細胞の割合の増加を示す。グラフの傾きが緩やかな場合は、グラフの傾き急な場合と比較して、より多くの時間が細胞接着に必要なことを示す。

【図 16 D】図 16 D は、図 16 C 中のグラフを拡大して示したものである。

【図 17】図 17 は、本発明の方法をコンピュータにおいて実行したときの一構成例を示す。

【図 18 A】図 18 A は、本発明の数理的解析法の一例を示す。

【図 18 B】図 18 B は、本発明の数理的解析法の別の一例を示す。

【図 19】図 19 は、本発明で用いたプロモーター含有プラスミド例および本発明の解析の一例を示す。

【図 20】図 20 は、分化誘導初期における数理的解析結果の一例を示す。

【図 21】図 21 は、未分化維持における数理的解析結果の一例を示す。

【図 22】図 22 は、カクテルパーティープロセスの模式図を示す。

【図 23】図 23 は、遺伝子転写スイッチレポーター（本発明において使用されるトランスフェクションプラスミド）の構築例を示す。

【図 24】図 24 は、転写因子レポーターセットの構築例を示す。

【図 25】図 25 は、転写因子レポーターのアッセイ例を示す。

【図 26】図 26 は、骨分化過程における転写因子活性の時系列測定例を示す。

【図 27】図 27 は、転写因子活性の振動現象および位相解析の例を示す。

【図 28】図 28 は、siRNA 実験のプロトコルを示す。

【図 29】図 29 は、siRNA 実験の結果を示す。上は hMSC での結果を示し、下は HeLa 細胞での結果を示す。数字は、siRNA の濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) を示す。抗 GFP siRNA での結果を左に示し、右にはスクランブル siRNA での結果を示す。

【図 30】図 30 は、テトラサイクリン依存性プロモーターを使用したときの変化の様子を示す。

【図 31】図 31 は、テトラサイクリン依存性プロモーターおよびテトラサイクリン非依存性プロモーターを用いたときの、発現の様子を示す図である。

【図 32】システム構成例である。

【図 33 A】図 33 A は、本発明のデジタル細胞の一例である。

【図 33 B】図 33 B は、本発明のデジタル細胞の別の例である。

【図 34】図 34 は、本発明のデジタル細胞の生産方法の一例を示す。

【図 35】図 35 は、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコンピュータシステム 3501 の構成の一例を示す。

【図 36】図 36 は、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供する処理の手順の一例を示す。

【図 37】図 37 は、サービスリクエスト 3510 に細胞パラメータと環境パラメータと刺激パラメータとを入力する入力画面の一例を示す。

【図 38】図 38 は、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供するコンピュータシステム 3801 の構成の一例を示す。

【図 39】図 39 は、デジタル細胞を用いて現実の細胞に対する実験結果を再現するサービスを提供する処理の手順の一例を示す。

#### 【配列表フリーテキスト】

【0764】

(配列の説明)

配列番号 1：フィブロネクチンの核酸配列（ヒト）

配列番号 2：フィブロネクチンのアミノ酸配列（ヒト）

配列番号 3：ビトロネクチンの核酸配列（マウス）

配列番号 4：ビトロネクチンのアミノ酸配列（マウス）

配列番号 5：ラミニンの核酸配列（マウス  $\alpha$  鎖）

配列番号 6：ラミニンのアミノ酸配列（マウス  $\alpha$  鎖）

配列番号 7：ラミニンの核酸配列（マウス  $\beta$  鎖）

配列番号 8：ラミニンのアミノ酸配列（マウス  $\beta$  鎖）

配列番号 9：ラミニンの核酸配列（マウス  $\gamma$  鎖）

配列番号 10：ラミニンのアミノ酸配列（マウス  $\gamma$  鎖）

配列番号 11：フィブロネクチンのアミノ酸配列（ウシ）

配列番号 12：実施例で使用した siRNA



- 配列番号13: マウスの嗅覚レセプター I7 (heptanal-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 (Accession Number) AF106007)。
- 配列番号14: 配列番号13に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号15: マウスの嗅覚レセプター S1 (mc9/bc9-equi-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 AF121972)。
- 配列番号16: 配列番号15に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号17: マウスの嗅覚レセプター S50 (cc9-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 AF121980)。
- 配列番号18: 配列番号17に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号19: マウスの嗅覚レセプター S19 (mc9/mh9/bc9-equi-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 AF121976)。
- 配列番号20: 配列番号19に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号21: マウスの OR23 (lyral-sensitive) (Genbank登録番号 X92969のコード領域のみ) の核酸。
- 配列番号22: 配列番号21に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号23: マウスの嗅覚レセプターについての mOR-EV (vanillin-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 AB061229)。
- 配列番号24: 配列番号23に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号25: マウスの or37a の核酸 (Genbank登録番号 AJ133424)。
- 配列番号26: 配列番号25に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号27: マウスの嗅覚レセプター C6 の核酸 (Genbank登録番号 AF102523)。
- 配列番号28: 配列番号27に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号29: マウスの嗅覚レセプター F5 の核酸 (Genbank登録番号 AF102531)。
- 配列番号30: 配列番号29に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号31: マウスの嗅覚レセプター S6 の核酸 (Genbank登録番号 AF121974)。
- 配列番号32: 配列番号31に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号33: マウスの嗅覚レセプター S18 の核酸 (Genbank登録番号 AF121975)。
- 配列番号34: 配列番号33に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号35: マウスの嗅覚レセプター S25 の核酸 (Genbank登録番号 AF121977)。
- 配列番号36: 配列番号35に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号37: マウスの嗅覚レセプター S46 の核酸 (Genbank登録番号 AF121979)。
- 配列番号38: 配列番号37に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号39: マウスの G タンパク質  $\alpha$  サブユニットの核酸 (Genbank登録番号 M36778)。
- 配列番号40: 配列番号39に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号41: マウスの G タンパク質  $\beta$  サブユニットの核酸 (Genbank登録番号 M87286)。
- 配列番号42: 配列番号41に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号43: マウスの G タンパク質  $\gamma$  サブユニットの核酸 (Genbank登録番号 U37527)。
- 配列番号44: 配列番号43に記載の核酸にコードされるタンパク質。
- 配列番号45: マウスの上皮増殖因子 (EGF) レセプターの核酸 (Genbank登録番号 AF121979)。

録番号 B C 0 2 3 7 2 9 ) 。

配列番号 4 6 : 配列番号 4 5 に記載の核酸にコードされるタンパク質。

【配列表】

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Digital cell

<130> J1-03624274

<160> 46

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

&lt;211&gt; 1929

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> CDS

<222> (1)..(1929)

<223> fibronectin 1

<400> 1

atg ctt agg ggt ccg ggg ccc ggg ctg ctg ctg ctg gcc gtc cag tgc 48  
Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Leu Ala Val Gln Cys  
1 5 10 15

ctg ggg aca gcg gtg ccc tcc acg gga gcc tcg aag agc aag agg cag 96  
Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Thr Gly Ala Ser Lys Ser Lys Arg Gln  
20 25 30

gct cag caa atg gtt cag ccc cag tcc ccg gtg gct gtc agt caa agc 144  
Ala Gln Gln Met Val Gln Pro Gln Ser Pro Val Ala Val Ser Gln Ser  
35 40 45

aag ccc ggt tgt tat gac aat gga aaa cac tat cag ata aat caa cag 192  
Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln  
50 55 60

tgg gag cgg acc tac cta ggc aat gcg ttg gtt tgt act tgt tat gga 240  
Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Asn Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr Gly  
65 70 75 80

gga agc cga ggt ttt aac tgc gag agt aaa cct gaa gct gaa gag act 288  
Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Ala Glu Glu Thr  
85 90 95

tgc ttt gac aag tac act ggg aac act tac cga gtg ggt gac act tat	336
Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr Tyr	
100 105 110	
gag cgt cct aaa gac tcc atg atc tgg gac tgt acc tgc atc ggg gct	384
Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly Ala	
115 120 125	
ggg cga ggg aga ata agc tgt acc atc gca aac cgc tgc cat gaa ggg	432
Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu Gly	
130 135 140	
ggt cag tcc tac aag att ggt gac acc tgg agg aga cca cat gag act	480
Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu Thr	
145 150 155 160	
ggt ggt tac atg tta gag tgt gtg tgt ctt ggt aat gga aaa gga gaa	528
Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu	
165 170 175	
tgg acc tgc aag ccc ata gct gag aag tgt ttt gat cat gct gct ggg	576
Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp His Ala Ala Gly	
180 185 190	
act tcc tat gtg gtc gga gaa acg tgg gag aag ccc tac caa ggc tgg	624
Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Trp	
195 200 205	
atg atg gta gat tgt act tgc ctg gga gaa ggc agc gga cgc atc act	672
Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile Thr	
210 215 220	
tgc act tct aga aat aga tgc aac gat cag gac aca agg aca tcc tat	720
Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser Tyr	
225 230 235 240	
aga att gga gac acc tgg agc aag aag gat aat cga gga aac ctg ctc	768
Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu Leu	
245 250 255	
cag tgc atc tgc aca ggc aac ggc cga gga gag tgg aag tgt gag agg	816
Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu Arg	
260 265 270	
cac acc tct gtg cag acc aca tcg agc gga tct ggc ccc ttc acc gat	864
His Thr Ser Val Gln Thr Thr Ser Ser Gly Ser Gly Pro Phe Thr Asp	
275 280 285	
gtt cgt gca gct gtt tac caa ccg cag cct cac ccc cag cct cct ccc	912
Val Arg Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro	

290	295	300	
tat ggc cac tgt gtc aca gac agt ggt gtg gtc tac tct gtg ggg atg Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met 305 310 315 320			960
cag tgg ctg aag aca caa gga aat aag caa atg ctt tgc acg tgc ctg Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu 325 330 335			1008
ggc aac gga gtc agc tgc caa gag aca gct gta acc cag act tac ggt Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly 340 345 350			1056
ggc aac tca aat gga gag cca tgt gtc tta cca ttc acc tac aat ggc Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn Gly 355 360 365			1104
agg acg gac agc aca act tcg aat tat gag cag gac cag aaa tac tct Arg Thr Asp Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser 370 375 380			1152
ttc tgc aca gac cac act gtt ttg gtt cag act cga gga gga aat tcc Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser 385 390 395 400			1200
aat ggt gcc ttg tgc cac ttc ccc ttc cta tac aac aac cac aat tac Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr 405 410 415			1248
act gat tgc act tct gag ggc aga aga gac aac atg aag tgg tgt ggg Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly 420 425 430			1296
acc aca cag aac tat gat gcc gac cag aag ttt ggg ttc tgc ccc atg Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met 435 440 445			1344
gct gcc cac gag gaa atc tgc aca acc aat gaa ggg gtc atg tac cgc Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg 450 455 460			1392
att gga gat cag tgg gat aag cag cat gac atg ggt cac atg atg agg Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg 465 470 475 480			1440
tgc acg tgt gtt ggg aat ggt cgt ggg gaa tgg aca tgc att gcc tac Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr 485 490 495			1488

tcg cag ctt cga gat cag tgc att gtt gat gac atc act tac aat gtg Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val 500 505 510	1536
aac gac aca ttc cac aag cgt cat gaa gag ggg cac atg ctg aac tgt Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys 515 520 525	1584
aca tgc ttc ggt cag ggt cgg ggc agg tgg aag tgt gat ccc gtc gac Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp 530 535 540	1632
caa tgc cag gat tca gag act ggg acg ttt tat caa att gga gat tca Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser 545 550 555 560	1680
tgg gag aag tat gtg cat ggt gtc aga tac cag tgc tac tgc tat ggc Trp Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly 565 570 575	1728
cgt ggc att ggg gag tgg cat tgc caa cct tta cag acc tat cca agc Arg Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser 580 585 590	1776
tca agt ggt cct gtc gaa gta ttt atc act gag act ccg agt cag ccc Ser Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro 595 600 605	1824
aac tcc cac ccc atc cag tgg aat gca cca cag cca tct cac att tcc Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser 610 615 620	1872
aag tac att ctc agg tgg aga cct gtg agt atc cca ccc aga aac ctt Lys Tyr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Val Ser Ile Pro Pro Arg Asn Leu 625 630 635 640	1920
gga tac tga Gly Tyr	1929

<210> 2  
 <211> 642  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Leu	Arg	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Gln	Cys
1				5				10						15	

Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Thr Gly Ala Ser Lys Ser Lys Arg Gln  
 20 25 30

Ala Gln Gln Met Val Gln Pro Gln Ser Pro Val Ala Val Ser Gln Ser  
 35 40 45

Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln  
 50 55 60

Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Asn Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr Gly  
 65 70 75 80

Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Ala Glu Glu Thr  
 85 90 95

Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr Tyr  
 100 105 110

Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly Ala  
 115 120 125

Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu Gly  
 130 135 140

Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu Thr  
 145 150 155 160

Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu  
 165 170 175

Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp His Ala Ala Gly  
 180 185 190

Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Trp  
 195 200 205



Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile Thr  
210 215 220

Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser Tyr  
225 230 235 240

Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu Leu  
245 250 255

Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu Arg  
260 265 270

His Thr Ser Val Gln Thr Thr Ser Ser Gly Ser Gly Pro Phe Thr Asp  
275 280 285

Val Arg Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro  
290 295 300

Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met  
305 310 315 320

Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu  
325 330 335

Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly  
340 345 350

Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn Gly  
355 360 365

Arg Thr Asp Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser  
370 375 380

Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser  
385 390 395 400

Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr

405

410

415

Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly  
 420 425 430

Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met  
 435 440 445

Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg  
 450 455 460

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg  
 465 470 475 480

Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr  
 485 490 495

Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val  
 500 505 510

Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys  
 515 520 525

Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp  
 530 535 540

Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser  
 545 550 555 560

Trp Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly  
 565 570 575

Arg Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser  
 580 585 590

Ser Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro  
 595 600 605

Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser  
 610 615 620

Lys Tyr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Val Ser Ile Pro Pro Arg Asn Leu  
 625 630 635 640

Gly Tyr

<210> 3  
 <211> 1437  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1437)  
 <223> vitronectin

<400> 3  
 atg gca ccc ctg agg ccc ttt ttc ata cta gcc ctg gtg gca tgg gtt 48  
 Met Ala Pro Leu Arg Pro Phe Phe Ile Leu Ala Leu Val Ala Trp Val  
 1 5 10 15

tct ctg gct gac caa gag tca tgc aag ggc cgc tgc act cag ggt ttc 96  
 Ser Leu Ala Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Gln Gly Phe  
 20 25 30

atg gcc agc aag aag tgt cag tgt gac gag ctt tgc act tac tat cag 144  
 Met Ala Ser Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Thr Tyr Tyr Gln  
 35 40 45

agc tgc tgt gcc gac tac atg gag cag tgc aag ccc caa gta acg cgg 192  
 Ser Cys Cys Ala Asp Tyr Met Glu Gln Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg  
 50 55 60

ggg gac gtg ttc act atg cca gag gat gat tat tgg agc tat gac tac 240  
 Gly Asp Val Phe Thr Met Pro Glu Asp Asp Tyr Trp Ser Tyr Asp Tyr  
 65 70 75 80

gtg gag gag ccc aag aac aat acc aac acc ggt gtg caa ccc gag aac 288  
 Val Glu Glu Pro Lys Asn Asn Thr Asn Thr Gly Val Gln Pro Glu Asn  
 85 90 95

acc tct cca ccc ggt gac cta aat cct cgg acg gac ggc act cta aag 336

Thr Ser Pro Pro Gly Asp Leu Asn Pro Arg Thr Asp Gly Thr Leu Lys	
100 105 110	
ccg aca gcc ttc cta gat cct gag gaa cag cca agc acc cca gcg cct	384
Pro Thr Ala Phe Leu Asp Pro Glu Glu Gln Pro Ser Thr Pro Ala Pro	
115 120 125	
aaa gtg gag caa cag gag gag atc cta agg ccc gac acc act gat caa	432
Lys Val Glu Gln Gln Glu Glu Ile Leu Arg Pro Asp Thr Thr Asp Gln	
130 135 140	
ggg acc cct gag ttt cca gag gaa gaa ctg tgc agt gga aag ccc ttt	480
Gly Thr Pro Glu Phe Pro Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe	
145 150 155 160	
gac gcc ttc acg gat ctc aag aat ggg tcc ctc ttt gcc ttc cga ggg	528
Asp Ala Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly	
165 170 175	
cag tac cgc tgt gag cta gat gag acg gca gtg agg cct ggg tac ccc	576
Gln Tyr Arg Cys Glu Leu Asp Glu Thr Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro	
180 185 190	
aaa ctt atc caa gat gtc tgg ggc att gag ggc ccc atc gat gct gcc	624
Lys Leu Ile Gln Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala	
195 200 205	
ttc act cgc atc aac tgt cag ggg aag acc tac ttg ttc aag ggt agt	672
Phe Thr Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser	
210 215 220	
cag tac tgg cgc ttt gag gat ggg gtc ctg gac cct ggt tat ccc cga	720
Gln Tyr Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Gly Tyr Pro Arg	
225 230 235 240	
aac atc tcc gaa ggc ttc agt ggc ata cca gac aat gtt gat gca gcg	768
Asn Ile Ser Glu Gly Phe Ser Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala	
245 250 255	
ttc gcc ctt cct gcc cac cgt tac agt ggc cgg gaa agg gtc tac ttc	816
Phe Ala Leu Pro Ala His Arg Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe	
260 265 270	
ttc aag ggg aag cag tac tgg gag cac gaa ttt cag cag caa ccc agc	864
Phe Lys Gly Lys Gln Tyr Trp Glu His Glu Phe Gln Gln Gln Pro Ser	
275 280 285	
cag gag gag tgc gaa ggc agc tct ctg tca gcc gtg ttt gag cac ttt	912
Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe	
290 295 300	

gcc ttg ctt cag cgg gac agc tgg gag aac att ttc gaa ctc ctc ttc 960  
 Ala Leu Leu Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asn Ile Phe Glu Leu Leu Phe  
 305 310 315 320

tgg ggc aga tcc tct gat gga gcc aga gaa ccc caa ttc atc agc cgg 1008  
 Trp Gly Arg Ser Ser Asp Gly Ala Arg Glu Pro Gln Phe Ile Ser Arg  
 325 330 335

aac tgg cat ggt gtg cca ggg aaa gtg gac gct gct atg gcc ggc cgc 1056  
 Asn Trp His Gly Val Pro Gly Lys Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg  
 340 345 350

atc tac gtc act ggc tcc tta tcc cac tct gcc caa gcc aaa aaa cag 1104  
 Ile Tyr Val Thr Gly Ser Leu Ser His Ser Ala Gln Ala Lys Lys Gln  
 355 360 365

ccg tct aag cgt aga agc cga aag cgc tat cgt tca cgc cga ggg cgt 1152  
 Pro Ser Lys Arg Arg Ser Arg Lys Arg Tyr Arg Ser Arg Arg Gly Arg  
 370 375 380

ggc cac aga cgc agc cag agc tcg aac tcc cgt cgt tca tca cgt tca 1200  
 Gly His Arg Arg Ser Gln Ser Ser Asn Ser Arg Arg Ser Ser Arg Ser  
 385 390 395 400

atc tgg ttc tct ttg ttc tcc agc gag gag agt ggg cta gga acc tac 1248  
 Ile Trp Phe Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Gly Leu Gly Thr Tyr  
 405 410 415

aac aac tat gat tat gat atg gac tgg ctt gta cct gcc acc tgc gag 1296  
 Asn Asn Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu  
 420 425 430

ccc att cag agc gtc tat ttc ttc tct gga gac aaa tac tac cga gtc 1344  
 Pro Ile Gln Ser Val Tyr Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val  
 435 440 445

aac ctt aga acc cgg cga gtg gac tct gtg aat cct ccc tac cca cgc 1392  
 Asn Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Ser Val Asn Pro Pro Tyr Pro Arg  
 450 455 460

tcc att gct cag tat tgg ctg ggc tgc ccg acc tct gag aag tag 1437  
 Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Thr Ser Glu Lys  
 465 470 475

<210> 4  
 <211> 478  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 4

Met Ala Pro Leu Arg Pro Phe Phe Ile Leu Ala Leu Val Ala Trp Val  
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Gln Gly Phe  
 20 25 30

Met Ala Ser Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Thr Tyr Tyr Gln  
 35 40 45

Ser Cys Cys Ala Asp Tyr Met Glu Gln Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg  
 50 55 60

Gly Asp Val Phe Thr Met Pro Glu Asp Asp Tyr Trp Ser Tyr Asp Tyr  
 65 70 75 80

Val Glu Glu Pro Lys Asn Asn Thr Asn Thr Gly Val Gln Pro Glu Asn  
 85 90 95

Thr Ser Pro Pro Gly Asp Leu Asn Pro Arg Thr Asp Gly Thr Leu Lys  
 100 105 110

Pro Thr Ala Phe Leu Asp Pro Glu Glu Gln Pro Ser Thr Pro Ala Pro  
 115 120 125

Lys Val Glu Gln Gln Glu Glu Ile Leu Arg Pro Asp Thr Thr Asp Gln  
 130 135 140

Gly Thr Pro Glu Phe Pro Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe  
 145 150 155 160

Asp Ala Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly  
 165 170 175

Gln Tyr Arg Cys Glu Leu Asp Glu Thr Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro  
 180 185 190

Lys Leu Ile Gln Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala  
195 200 205

Phe Thr Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser  
210 215 220

Gln Tyr Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Gly Tyr Pro Arg  
225 230 235 240

Asn Ile Ser Glu Gly Phe Ser Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala  
245 250 255

Phe Ala Leu Pro Ala His Arg Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe  
260 265 270

Phe Lys Gly Lys Gln Tyr Trp Glu His Glu Phe Gln Gln Gln Pro Ser  
275 280 285

Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe  
290 295 300

Ala Leu Leu Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asn Ile Phe Glu Leu Leu Phe  
305 310 315 320

Trp Gly Arg Ser Ser Asp Gly Ala Arg Glu Pro Gln Phe Ile Ser Arg  
325 330 335

Asn Trp His Gly Val Pro Gly Lys Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg  
340 345 350

Ile Tyr Val Thr Gly Ser Leu Ser His Ser Ala Gln Ala Lys Lys Gln  
355 360 365

Pro Ser Lys Arg Arg Ser Arg Lys Arg Tyr Arg Ser Arg Arg Gly Arg  
370 375 380



Gly His Arg Arg Ser Gln Ser Ser Asn Ser Arg Arg Ser Ser Arg Ser  
385 390 395 400

Ile Trp Phe Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Gly Leu Gly Thr Tyr  
405 410 415

Asn Asn Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu  
420 425 430

Pro Ile Gln Ser Val Tyr Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val  
435 440 445

Asn Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Ser Val Asn Pro Pro Tyr Pro Arg  
450 455 460

Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Thr Ser Glu Lys  
465 470 475

<210> 5

<211> 9511

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (121)..(9372)

<223> laminin-2 alpha chain

<400> 5

ggcacgagct gcaactccgt gggctccggg aggagtggat ctgctccggc caggatgcct 60

gcggccaccg ccgggatcct cttgctcctg ctcttgggga cgctcgaagg ctcccagact 120

cag cgg cga cag tcc caa gcg cat caa cag aga ggt tta ttt cct gct 168  
Gln Arg Arg Gln Ser Gln Ala His Gln Gln Arg Gly Leu Phe Pro Ala  
1 5 10 15

gtc ctg aat ctt gct tcg aat gca ctc atc aca acc aat gct aca tgt 216  
Val Leu Asn Leu Ala Ser Asn Ala Leu Ile Thr Thr Asn Ala Thr Cys  
20 25 30

ggg gaa aaa gga ccc gag atg tac tgc aag ttg gtg gaa cat gtc ccc 264

Gly Glu Lys Gly Pro Glu Met Tyr Cys Lys Leu Val Glu His Val Pro  
 35 40 45  
 ggg cag cct gtg agg aac cct cag tgc cga atc tgc aat cag aac agc 312  
 Gly Gln Pro Val Arg Asn Pro Gln Cys Arg Ile Cys Asn Gln Asn Ser  
 50 55 60  
 agc aat cca tac cag agg cac ccg att acg aat gct att gat ggc aag 360  
 Ser Asn Pro Tyr Gln Arg His Pro Ile Thr Asn Ala Ile Asp Gly Lys  
 65 70 75 80  
 aac aca tgg tgg cag agt ccc agt atc aag aat gga gtg gaa tac cat 408  
 Asn Thr Trp Trp Gln Ser Pro Ser Ile Lys Asn Gly Val Glu Tyr His  
 85 90 95  
 tat gtg aca att act ctg gat tta cag cag gtg ttc cag att gcc tac 456  
 Tyr Val Thr Ile Thr Leu Asp Leu Gln Gln Val Phe Gln Ile Ala Tyr  
 100 105 110  
 gta att gtg aag gca gcc aat tcc cct cgg cct gga aac tgg att ttg 504  
 Val Ile Val Lys Ala Ala Asn Ser Pro Arg Pro Gly Asn Trp Ile Leu  
 115 120 125  
 gaa cgt tcc ctg gat gac gtg gag tac aaa ccc tgg cag tat cat gcg 552  
 Glu Arg Ser Leu Asp Asp Val Glu Tyr Lys Pro Trp Gln Tyr His Ala  
 130 135 140  
 gtg aca gac acg gag tgc ctg acc ctc tac aat atc tat ccc cgc act 600  
 Val Thr Asp Thr Glu Cys Leu Thr Leu Tyr Asn Ile Tyr Pro Arg Thr  
 145 150 155 160  
 gga cca cca tcc tac gcc aaa gat gat gag gtc atc tgc act tca ttt 648  
 Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Lys Asp Asp Glu Val Ile Cys Thr Ser Phe  
 165 170 175  
 tat tcg aag atc cac cct tta gaa aat gga gag att cac att tct ttg 696  
 Tyr Ser Lys Ile His Pro Leu Glu Asn Gly Glu Ile His Ile Ser Leu  
 180 185 190  
 atc aat ggg aga cca agt gct gat gac ccc tcc cct gaa ctc ctg gaa 744  
 Ile Asn Gly Arg Pro Ser Ala Asp Asp Pro Ser Pro Glu Leu Leu Glu  
 195 200 205  
 ttc acc tct gct cgc tac att cgc ctg aga ttt cag agg atc cgc acc 792  
 Phe Thr Ser Ala Arg Tyr Ile Arg Leu Arg Phe Gln Arg Ile Arg Thr  
 210 215 220  
 ttg aat gca gac ttg atg atg ttt gct cac aaa gac ccc aga gaa atc 840  
 Leu Asn Ala Asp Leu Met Met Phe Ala His Lys Asp Pro Arg Glu Ile  
 225 230 235 240

gat ccc att gtc aca cga aga tat tac tat tct gtc aag gat att tca Asp Pro Ile Val Thr Arg Arg Tyr Tyr Tyr Ser Val Lys Asp Ile Ser 245 250 255	888
gtt ggc ggg atg tgc atc tgt tat ggt cat gcc cgg gct tgt cca ctt Val Gly Gly Met Cys Ile Cys Tyr Gly His Ala Arg Ala Cys Pro Leu 260 265 270	936
gac cct gca aca aat aaa tca cgc tgt gag tgt gaa cat aac acc tgt Asp Pro Ala Thr Asn Lys Ser Arg Cys Glu Cys Glu His Asn Thr Cys 275 280 285	984
ggg gaa agc tgt gac agg tgc tgt cca gga ttc cat cag aag cct tgg Gly Glu Ser Cys Asp Arg Cys Cys Pro Gly Phe His Gln Lys Pro Trp 290 295 300	1032
aga gct gga acc ttc ctc acc aag tct gag tgt gaa gca tgc aat tgt Arg Ala Gly Thr Phe Leu Thr Lys Ser Glu Cys Glu Ala Cys Asn Cys 305 310 315 320	1080
cac gga aaa gct gag gaa tgc tat tat gat gaa act gtt gct agc aga His Gly Lys Ala Glu Glu Cys Tyr Tyr Asp Glu Thr Val Ala Ser Arg 325 330 335	1128
aat cta agt tta aat ata cat ggg aag tac atc gga ggg ggt gtg tgc Asn Leu Ser Leu Asn Ile His Gly Lys Tyr Ile Gly Gly Gly Val Cys 340 345 350	1176
atc aac tgc aca cat aac acg gct ggg ata aat tgt gag aca tgt gtt Ile Asn Cys Thr His Asn Thr Ala Gly Ile Asn Cys Glu Thr Cys Val 355 360 365	1224
gat gga ttc ttc aga ccc aaa ggg gtg tca cca aat tat cca aga cca Asp Gly Phe Phe Arg Pro Lys Gly Val Ser Pro Asn Tyr Pro Arg Pro 370 375 380	1272
tgc cag cca tgt cac tgt gat cca act ggc tcc ctt agt gaa gtc tgt Cys Gln Pro Cys His Cys Asp Pro Thr Gly Ser Leu Ser Glu Val Cys 385 390 395 400	1320
gtc aaa gat gag aaa tac gcc cag cga ggg ttg aaa cct gga tcc tgt Val Lys Asp Glu Lys Tyr Ala Gln Arg Gly Leu Lys Pro Gly Ser Cys 405 410 415	1368
cac tgc aaa act ggc ttt gga ggc gtg aac tgt gat cgc tgt gtc agg His Cys Lys Thr Gly Phe Gly Gly Val Asn Cys Asp Arg Cys Val Arg 420 425 430	1416
ggg tac cat ggt tac cca gac tgc caa ccc tgt aac tgt agt ggc ttg	1464

Gly Tyr His Gly Tyr Pro Asp Cys Gln Pro Cys Asn Cys Ser Gly Leu	
435 440 445	
ggg agc aca aat gag gac cct tgc gtt ggg ccc tgt agc tgt aag gag	1512
Gly Ser Thr Asn Glu Asp Pro Cys Val Gly Pro Cys Ser Cys Lys Glu	
450 455 460	
aat gtt gaa ggt gaa gac tgt agt cgt tgc aaa tct ggt ttc ttc aac	1560
Asn Val Glu Gly Glu Asp Cys Ser Arg Cys Lys Ser Gly Phe Phe Asn	
465 470 475 480	
ttg caa gaa gat aat cag aaa ggc tgt gag gag tgt ttc tgt tca gga	1608
Leu Gln Glu Asp Asn Gln Lys Gly Cys Glu Glu Cys Phe Cys Ser Gly	
485 490 495	
gta tca aac aga tgt cag agt tcc tac tgg acc tat ggg aat att caa	1656
Val Ser Asn Arg Cys Gln Ser Ser Tyr Trp Thr Tyr Gly Asn Ile Gln	
500 505 510	
gac atg cgt ggt tgg tat ctc aca gac ctc tct ggc cgc att cgg atg	1704
Asp Met Arg Gly Trp Tyr Leu Thr Asp Leu Ser Gly Arg Ile Arg Met	
515 520 525	
gct ccc cag ctt gat aac cct gac tca cct cag cag atc agc atc agt	1752
Ala Pro Gln Leu Asp Asn Pro Asp Ser Pro Gln Gln Ile Ser Ile Ser	
530 535 540	
aac tct gag gcc cgg aaa tcc ctg ctt gat ggt tac tac tgg agt gca	1800
Asn Ser Glu Ala Arg Lys Ser Leu Leu Asp Gly Tyr Tyr Trp Ser Ala	
545 550 555 560	
ccg cct cca tat ctg gga aac aga ctt cca gct gtt ggg gga cag ttg	1848
Pro Pro Pro Tyr Leu Gly Asn Arg Leu Pro Ala Val Gly Gly Gln Leu	
565 570 575	
tca ttt acc atc tca tat gac ctc gaa gaa gag gaa gac gat aca gaa	1896
Ser Phe Thr Ile Ser Tyr Asp Leu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Thr Glu	
580 585 590	
aaa ctc ctt cag ctg atg att atc ttt gag gga aat gac tta aga atc	1944
Lys Leu Leu Gln Leu Met Ile Ile Phe Glu Gly Asn Asp Leu Arg Ile	
595 600 605	
agc aca gcg tat aag gag gtg tac tta gag cca tct gaa gaa cac gtt	1992
Ser Thr Ala Tyr Lys Glu Val Tyr Leu Glu Pro Ser Glu Glu His Val	
610 615 620	
gag gag gtg tca ctc aaa gaa gag gcc ttt act ata cat gga aca aat	2040
Glu Glu Val Ser Leu Lys Glu Glu Ala Phe Thr Ile His Gly Thr Asn	
625 630 635 640	

ttg cca gtc act aga aaa gat ttc atg att gtt ctc aca aat ttg gga Leu Pro Val Thr Arg Lys Asp Phe Met Ile Val Leu Thr Asn Leu Gly 645 650 655	2088
gag atc ctt atc caa atc aca tac aac tta ggg atg gac gcc atc ttc Glu Ile Leu Ile Gln Ile Thr Tyr Asn Leu Gly Met Asp Ala Ile Phe 660 665 670	2136
agg ctg agt tct gtc aat ctt gaa tct cct gtc cct tat cct act gat Arg Leu Ser Ser Val Asn Leu Glu Ser Pro Val Pro Tyr Pro Thr Asp 675 680 685	2184
aga cgt att gca act gat gtg gaa gtt tgc cag tgt cca cct ggg tac Arg Arg Ile Ala Thr Asp Val Glu Val Cys Gln Cys Pro Pro Gly Tyr 690 695 700	2232
agt ggc agc tct tgt gaa aca tgt tgg cct agg cac cga aga gtt aac Ser Gly Ser Ser Cys Glu Thr Cys Trp Pro Arg His Arg Arg Val Asn 705 710 715 720	2280
ggc acc att ttt ggt ggc att tgt gaa cca tgt cag tgc ttt gct cat Gly Thr Ile Phe Gly Gly Ile Cys Glu Pro Cys Gln Cys Phe Ala His 725 730 735	2328
gca gaa gcc tgt gat gac atc aca gga gaa tgt ctg aac tgt aag gat Ala Glu Ala Cys Asp Asp Ile Thr Gly Glu Cys Leu Asn Cys Lys Asp 740 745 750	2376
cac aca ggt ggg ccg tac tgc aat gaa tgt ctc cct gga ttc tat ggt His Thr Gly Gly Pro Tyr Cys Asn Glu Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Gly 755 760 765	2424
gat cct act cga gga agc cct gaa gac tgt cag ccc tgt gcc tgt cca Asp Pro Thr Arg Gly Ser Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala Cys Pro 770 775 780	2472
ctc aat atc cca tca aat aac ttt agt cca aca tgc cat tta gac cgg Leu Asn Ile Pro Ser Asn Asn Phe Ser Pro Thr Cys His Leu Asp Arg 785 790 795 800	2520
agt ctg gga ttg atc tgt gac gag tgt cct att ggg tac aca gga ccg Ser Leu Gly Leu Ile Cys Asp Glu Cys Pro Ile Gly Tyr Thr Gly Pro 805 810 815	2568
cgc tgt gag agg tgt gca gaa ggc tat ttt gga caa cct tcc gta cct Arg Cys Glu Arg Cys Ala Glu Gly Tyr Phe Gly Gln Pro Ser Val Pro 820 825 830	2616
gga gga tca tgt cag cca tgc caa tgc aat gac aac ctt gac tac tcc	2664

Gly	Gly	Ser	Cys	Gln	Pro	Cys	Gln	Cys	Asn	Asp	Asn	Leu	Asp	Tyr	Ser	
		835					840					845				
atc	cct	ggc	agc	tgt	gac	agc	ctg	tct	ggc	tcc	tgt	ctg	att	tgt	aag	2712
Ile	Pro	Gly	Ser	Cys	Asp	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Cys	Leu	Ile	Cys	Lys	
	850					855					860					
cca	ggt	aca	aca	ggc	cgg	tac	tgt	gag	ctc	tgt	gct	gat	ggg	tat	ttt	2760
Pro	Gly	Thr	Thr	Gly	Arg	Tyr	Cys	Glu	Leu	Cys	Ala	Asp	Gly	Tyr	Phe	
865					870					875					880	
gga	gac	gcg	gtt	aat	aca	aag	aac	tgt	caa	cca	tgc	cgt	tgt	gat	atc	2808
Gly	Asp	Ala	Val	Asn	Thr	Lys	Asn	Cys	Gln	Pro	Cys	Arg	Cys	Asp	Ile	
				885					890					895		
aat	ggc	tcc	ttc	tca	gag	gat	tgt	cac	aca	aga	act	ggg	caa	tgt	gag	2856
Asn	Gly	Ser	Phe	Ser	Glu	Asp	Cys	His	Thr	Arg	Thr	Gly	Gln	Cys	Glu	
			900					905					910			
tgc	aga	ccc	aat	gtt	cag	ggg	cgg	cac	tgt	gac	gag	tgt	aag	cct	gaa	2904
Cys	Arg	Pro	Asn	Val	Gln	Gly	Arg	His	Cys	Asp	Glu	Cys	Lys	Pro	Glu	
		915					920					925				
acc	ttt	ggc	ctg	caa	ctg	gga	agg	ggt	tgt	ctg	ccc	tgc	aac	tgc	aat	2952
Thr	Phe	Gly	Leu	Gln	Leu	Gly	Arg	Gly	Cys	Leu	Pro	Cys	Asn	Cys	Asn	
	930					935					940					
tct	ttt	ggg	tct	aag	tcc	ttt	gac	tgt	gaa	gca	agt	ggg	cag	tgc	tgg	3000
Ser	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Phe	Asp	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Gln	Cys	Trp	
945					950					955					960	
tgc	cag	cct	gga	gta	gca	ggg	aag	aaa	tgt	gac	cgt	tgt	gcc	cat	ggc	3048
Cys	Gln	Pro	Gly	Val	Ala	Gly	Lys	Lys	Cys	Asp	Arg	Cys	Ala	His	Gly	
				965				970						975		
tac	ttc	aac	ttc	caa	gaa	gga	ggc	tgc	ata	gct	tgt	gac	tgt	tct	cat	3096
Tyr	Phe	Asn	Phe	Gln	Glu	Gly	Gly	Cys	Ile	Ala	Cys	Asp	Cys	Ser	His	
			980					985					990			
ctg	ggc	aac	aac	tgt	gac	cca	aaa	act	ggc	caa	tgc	att	tgc	cca	ccc	3144
Leu	Gly	Asn	Asn	Cys	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Gln	Cys	Ile	Cys	Pro	Pro	
		995					1000					1005				
aat	acc	act	gga	gaa	aag	tgt	tct	gag	tgt	ctt	ccc	aac	acc	tgg		3189
Asn	Thr	Thr	Gly	Glu	Lys	Cys	Ser	Glu	Cys	Leu	Pro	Asn	Thr	Trp		
	1010					1015					1020					
ggt	cac	agc	att	gtc	acc	ggc	tgt	aag	gtt	tgt	aac	tgc	agc	act		3234
Gly	His	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Cys	Lys	Val	Cys	Asn	Cys	Ser	Thr		
	1025					1030					1035					

gtg ggg tcc ttg gct tct cag tgc aat gta aac acg ggc cag tgc Val Gly Ser Leu Ala Ser Gln Cys Asn Val Asn Thr Gly Gln Cys 1040 1045 1050	3279
agc tgt cat cca aaa ttc tct ggt atg aaa tgc tca gag tgc agc Ser Cys His Pro Lys Phe Ser Gly Met Lys Cys Ser Glu Cys Ser 1055 1060 1065	3324
cga ggt cac tgg aac tat cct ctc tgc act cta tgt gac tgc ttc Arg Gly His Trp Asn Tyr Pro Leu Cys Thr Leu Cys Asp Cys Phe 1070 1075 1080	3369
ctt cca ggc aca gat gcc acg act tgt gat ctg gag act agg aaa Leu Pro Gly Thr Asp Ala Thr Thr Cys Asp Leu Glu Thr Arg Lys 1085 1090 1095	3414
tgc tcc tgt agt gat caa act gga cag tgc agc tgt aag gtg aat Cys Ser Cys Ser Asp Gln Thr Gly Gln Cys Ser Cys Lys Val Asn 1100 1105 1110	3459
gtg gaa ggc gtc cac tgt gac agg tgc cgg cct ggc aaa ttt gga Val Glu Gly Val His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Lys Phe Gly 1115 1120 1125	3504
cta gat gcc aag aac cca ctt ggc tgc agc agc tgc tac tgc ttt Leu Asp Ala Lys Asn Pro Leu Gly Cys Ser Ser Cys Tyr Cys Phe 1130 1135 1140	3549
gga gtt act agt caa tgc tct gaa gca aag ggg ctg atc cgt acg Gly Val Thr Ser Gln Cys Ser Glu Ala Lys Gly Leu Ile Arg Thr 1145 1150 1155	3594
tgg gtg act ttg agt gat gaa cag acc att cta cct ctg gtg gat Trp Val Thr Leu Ser Asp Glu Gln Thr Ile Leu Pro Leu Val Asp 1160 1165 1170	3639
gag gcc ctg cag cac acg act acc aaa ggc att gct ttc cag aaa Glu Ala Leu Gln His Thr Thr Thr Lys Gly Ile Ala Phe Gln Lys 1175 1180 1185	3684
cca gag att gtt gca aag atg gat gaa gtc agg caa gag ctc cat Pro Glu Ile Val Ala Lys Met Asp Glu Val Arg Gln Glu Leu His 1190 1195 1200	3729
ttg gaa cct ttt tac tgg aaa ctc cca caa caa ttt gaa ggg aaa Leu Glu Pro Phe Tyr Trp Lys Leu Pro Gln Gln Phe Glu Gly Lys 1205 1210 1215	3774
aag ttg atg gct tat ggt ggc aaa ctc aag tat gcc atc tat ttt	3819



Lys Leu Met Ala Tyr Gly Gly	Lys Leu Lys Tyr Ala Ile Tyr Phe	
1220	1225 1230	
gag gct cgg gat gag aca ggc	ttt gcc aca tat aaa cct caa gtt	3864
Glu Ala Arg Asp Glu Thr Gly	Phe Ala Thr Tyr Lys Pro Gln Val	
1235	1240 1245	
atc att cga ggt gga act cct	act cat gct aga att att acc aga	3909
Ile Ile Arg Gly Gly Thr Pro	Thr His Ala Arg Ile Ile Thr Arg	
1250	1255 1260	
cac atg gct gcc cct ctc att	ggc cag ttg aca cgg cat gaa ata	3954
His Met Ala Ala Pro Leu Ile	Gly Gln Leu Thr Arg His Glu Ile	
1265	1270 1275	
gaa atg aca gag aaa gaa tgg	aaa tat tat ggt gat gat cct cga	3999
Glu Met Thr Glu Lys Glu Trp	Lys Tyr Tyr Gly Asp Asp Pro Arg	
1280	1285 1290	
atc agt aga act gtg acc cgt	gaa gac ttc ttg gat ata cta tat	4044
Ile Ser Arg Thr Val Thr Arg	Glu Asp Phe Leu Asp Ile Leu Tyr	
1295	1300 1305	
gat att cac tat atc ctt atc	aag gct act tat gga aac gtt gtg	4089
Asp Ile His Tyr Ile Leu Ile	Lys Ala Thr Tyr Gly Asn Val Val	
1310	1315 1320	
aga caa agc cgc att tct gaa	atc tcc atg gaa gta gct gaa cca	4134
Arg Gln Ser Arg Ile Ser Glu	Ile Ser Met Glu Val Ala Glu Pro	
1325	1330 1335	
gga cat gta tta gca ggg agc	cca cca gca cac ttg ata gaa aga	4179
Gly His Val Leu Ala Gly Ser	Pro Pro Ala His Leu Ile Glu Arg	
1340	1345 1350	
tgc gat tgc cct cct ggc tat	tct ggc ttg tct tgt gag acg tgt	4224
Cys Asp Cys Pro Pro Gly Tyr	Ser Gly Leu Ser Cys Glu Thr Cys	
1355	1360 1365	
gca cca gga ttt tac cga ctt	cgt tct gaa cca ggt ggg cgg act	4269
Ala Pro Gly Phe Tyr Arg Leu	Arg Ser Glu Pro Gly Gly Arg Thr	
1370	1375 1380	
cct gga cca acc tta ggg acc	tgt gtt ccc tgc caa tgt aat gga	4314
Pro Gly Pro Thr Leu Gly Thr	Cys Val Pro Cys Gln Cys Asn Gly	
1385	1390 1395	
cac agc agt cag tgt gat cct	gag acc tca gta tgc cag aat tgt	4359
His Ser Ser Gln Cys Asp Pro	Glu Thr Ser Val Cys Gln Asn Cys	
1400	1405 1410	

cag cat	cac act gct ggt gac	ttc tgt gag cgc tgt	gcc ctt ggc	4404
Gln His	His Thr Ala Gly Asp	Phe Cys Glu Arg Cys	Ala Leu Gly	
1415	1420	1425		
tac tat	gga atc gtc agg gga	ttg cca aat gac tgc	caa cca tgt	4449
Tyr Tyr	Gly Ile Val Arg Gly	Leu Pro Asn Asp Cys	Gln Pro Cys	
1430	1435	1440		
gct tgt	cct ctg att tcg ccc	agc aac aat ttc agc	ccc tct tgt	4494
Ala Cys	Pro Leu Ile Ser Pro	Ser Asn Asn Phe Ser	Pro Ser Cys	
1445	1450	1455		
gta ttg	gaa ggt ctg gaa gat	tac cgt tgc acc gcc	tgc cca agg	4539
Val Leu	Glu Gly Leu Glu Asp	Tyr Arg Cys Thr Ala	Cys Pro Arg	
1460	1465	1470		
ggc tat	gaa gga cag tac tgt	gaa agg tgt gcc cca	ggc tat act	4584
Gly Tyr	Glu Gly Gln Tyr Cys	Glu Arg Cys Ala Pro	Gly Tyr Thr	
1475	1480	1485		
ggc agc	cca agc agc ccc gga	ggc tcc tgc caa gaa	tgt gag tgt	4629
Gly Ser	Pro Ser Ser Pro Gly	Gly Ser Cys Gln Glu	Cys Glu Cys	
1490	1495	1500		
gac cct	tat ggc tcc cta ccg	gtt ccc tgt gac cgg	gtc aca gga	4674
Asp Pro	Tyr Gly Ser Leu Pro	Val Pro Cys Asp Arg	Val Thr Gly	
1505	1510	1515		
ctc tgc	acg tgc cgc cct gga	gcc aca gga agg aag	tgt gat ggc	4719
Leu Cys	Thr Cys Arg Pro Gly	Ala Thr Gly Arg Lys	Cys Asp Gly	
1520	1525	1530		
tgc gag	cac tgg cat gca cgc	gag ggt gca gag tgt	gtc ttt tgt	4764
Cys Glu	His Trp His Ala Arg	Glu Gly Ala Glu Cys	Val Phe Cys	
1535	1540	1545		
gga gac	gag tgt aca ggc ctt	ctt ctt ggt gac ctg	gct cgt cta	4809
Gly Asp	Glu Cys Thr Gly Leu	Leu Leu Gly Asp Leu	Ala Arg Leu	
1550	1555	1560		
gag cag	atg acc atg aac atc	aac ctc acg ggc cca	ctg cct gct	4854
Glu Gln	Met Thr Met Asn Ile	Asn Leu Thr Gly Pro	Leu Pro Ala	
1565	1570	1575		
cca tat	aaa att ctg tat ggt	ctt gaa aat aca act	cag gaa ctc	4899
Pro Tyr	Lys Ile Leu Tyr Gly	Leu Glu Asn Thr Thr	Gln Glu Leu	
1580	1585	1590		
aag cac	ctg cta tca ccg caa	cgg gca cca gag agg	ctc att cag	4944

Lys His 1595	Leu Leu Ser Pro Gln 1600	Arg Ala Pro Glu Arg 1605	Leu Ile Gln	
ttg gca Leu Ala 1610	gag ggc aac gtg aac Glu Gly Asn Val Asn 1615	aca ctt gtg atg gaa Thr Leu Val Met Glu 1620	aca aat gag Thr Asn Glu	4989
ctg cta Leu Leu 1625	acc aga gca acc aaa Thr Arg Ala Thr Lys 1630	gtg aca gca gat ggt Val Thr Ala Asp Gly 1635	gag caa aca Glu Gln Thr	5034
gga caa Gly Gln 1640	gat gct gag agg acc Asp Ala Glu Arg Thr 1645	aac tcc aga gca gaa Asn Ser Arg Ala Glu 1650	tcc ttg gaa Ser Leu Glu	5079
gaa ttc Glu Phe 1655	att aaa ggg ctt gtc Ile Lys Gly Leu Val 1660	cag gat gct gaa gcc Gln Asp Ala Glu Ala 1665	ata aat gaa Ile Asn Glu	5124
aaa gct Lys Ala 1670	gta aaa cta aat gaa Val Lys Leu Asn Glu 1675	acc tta gga aat caa Thr Leu Gly Asn Gln 1680	gat aag aca Asp Lys Thr	5169
gca gag Ala Glu 1685	aga aac ttg gag gag Arg Asn Leu Glu Glu 1690	ctt caa aag gaa atc Leu Gln Lys Glu Ile 1695	gac cgg atg Asp Arg Met	5214
ctg aag Leu Lys 1700	gaa ctg aga agt aaa Glu Leu Arg Ser Lys 1705	gat ctt caa aca cag Asp Leu Gln Thr Gln 1710	aag gaa gtt Lys Glu Val	5259
gct gag Ala Glu 1715	gat gag ctc gtg gca Asp Glu Leu Val Ala 1720	gca gaa ggc ctt ctg Ala Glu Gly Leu Leu 1725	aag aga gta Lys Arg Val	5304
aac aag Asn Lys 1730	ctg ttt gga gag ccc Leu Phe Gly Glu Pro 1735	aga gcc cag aat gaa Arg Ala Gln Asn Glu 1740	gat atg gaa Asp Met Glu	5349
aag gat Lys Asp 1745	ctc cag cag aaa ctg Leu Gln Gln Lys Leu 1750	gca gag tac aag aac Ala Glu Tyr Lys Asn 1755	aaa ctt gat Lys Leu Asp	5394
gat gct Asp Ala 1760	tgg gat cta ttg aga Trp Asp Leu Leu Arg 1765	gaa gcc act gat aaa Glu Ala Thr Asp Lys 1770	acc cga gat Thr Arg Asp	5439
gct aat Ala Asn 1775	cgt ttg tct gct gcc Arg Leu Ser Ala Ala 1780	aat caa aaa aac atg Asn Gln Lys Asn Met 1785	acc ata ctg Thr Ile Leu	5484

gag aca Glu Thr 1790	aag aag gag gct att Lys Lys Glu Ala Ile 1795	gaa ggt agc aaa cga Glu Gly Ser Lys Arg 1800	caa ata gag Gln Ile Glu	5529
aac act Asn Thr 1805	tta aag gaa ggc aat Leu Lys Glu Gly Asn 1810	gac atc ctt gat gaa Asp Ile Leu Asp Glu 1815	gcc aat caa Ala Asn Gln	5574
ctc tta Leu Leu 1820	ggt gaa atc aac tca Gly Glu Ile Asn Ser 1825	gtc ata gat tat gtc Val Ile Asp Tyr Val 1830	gac gac att Asp Asp Ile	5619
aaa act Lys Thr 1835	aag ttg cca cca atg Lys Leu Pro Pro Met 1840	tcc gag gag ctg agt Ser Glu Glu Leu Ser 1845	gac aaa ata Asp Lys Ile	5664
gat gac Asp Asp 1850	ctc gcc cag gaa ata Leu Ala Gln Glu Ile 1855	aag gac aga agg ctt Lys Asp Arg Arg Leu 1860	gct gag aag Ala Glu Lys	5709
gtg ttc Val Phe 1865	cag gct gag agc cat Gln Ala Glu Ser His 1870	gct gct cag ctg aac Ala Ala Gln Leu Asn 1875	gac tcg tct Asp Ser Ser	5754
gct gta Ala Val 1880	ctt gat gga atc ctg Leu Asp Gly Ile Leu 1885	gat gag gct aag aac Asp Glu Ala Lys Asn 1890	atc tct ttc Ile Ser Phe	5799
aat gcc Asn Ala 1895	acg gca gcc ttc aga Thr Ala Ala Phe Arg 1900	gct tac agt aat att Ala Tyr Ser Asn Ile 1905	aaa gac tac Lys Asp Tyr	5844
att gat Ile Asp 1910	gaa gct gag aaa gtg Glu Ala Glu Lys Val 1915	gcc aga gaa gcc aaa Ala Arg Glu Ala Lys 1920	gag ctt gcc Glu Leu Ala	5889
caa ggg Gln Gly 1925	gct aca aaa ctg gca Ala Thr Lys Leu Ala 1930	aca agt cct cag ggc Thr Ser Pro Gln Gly 1935	tta tta aaa Leu Leu Lys	5934
gaa gat Glu Asp 1940	gcc aaa ggc tcc ctt Ala Lys Gly Ser Leu 1945	cag aaa agc ttc agg Gln Lys Ser Phe Arg 1950	atc ctc aat Ile Leu Asn	5979
gaa gcc Glu Ala 1955	aag aag cta gca aac Lys Lys Leu Ala Asn 1960	gat gtg aaa gga aat Asp Val Lys Gly Asn 1965	cac aat gat His Asn Asp	6024
cta aat	gac ctg aaa acc agg	tta gaa act gct gac	ctt aga aac	6069

Leu Asn 1970	Asp Leu Lys Thr Arg 1975	Leu Glu Thr Ala Asp 1980	Leu Arg Asn	
agt gga Ser Gly 1985	ctt cta gga gct cta Leu Leu Gly Ala Leu 1990	aat gac acc atg gac Asn Asp Thr Met Asp 1995	aag tta tca Lys Leu Ser	6114
gcc att Ala Ile 2000	aca aat gac acg gct Thr Asn Asp Thr Ala 2005	gct aaa ctg cag gct Ala Lys Leu Gln Ala 2010	gtc aaa gag Val Lys Glu	6159
aaa gcc Lys Ala 2015	aga gaa gcc aat gac Arg Glu Ala Asn Asp 2020	aca gca aaa gct gtc Thr Ala Lys Ala Val 2025	ctg gcc cag Leu Ala Gln	6204
gtt aag Val Lys 2030	gac ctg cat cag aac Asp Leu His Gln Asn 2035	cta gat ggc ctg aag Leu Asp Gly Leu Lys 2040	caa aac tac Gln Asn Tyr	6249
aat aaa Asn Lys 2045	ctg gca gac agc gtg Leu Ala Asp Ser Val 2050	gcc aaa acg aac gct Ala Lys Thr Asn Ala 2055	gtg gtg aaa Val Val Lys	6294
gat cct Asp Pro 2060	tcc aaa aac aaa atc Ser Lys Asn Lys Ile 2065	att gca gat gca ggc Ile Ala Asp Ala Gly 2070	act tcc gtg Thr Ser Val	6339
aga aat Arg Asn 2075	cta gaa cag gaa gct Leu Glu Gln Glu Ala 2080	gac cgg cta atc gac Asp Arg Leu Ile Asp 2085	aaa ctc aag Lys Leu Lys	6384
ccc atc Pro Ile 2090	aag gag ctt gag gac Lys Glu Leu Glu Asp 2095	aac cta aag aaa aac Asn Leu Lys Lys Asn 2100	att tct gaa Ile Ser Glu	6429
ata aag Ile Lys 2105	gaa ctg atc aac caa Glu Leu Ile Asn Gln 2110	gct cgg aaa caa gct Ala Arg Lys Gln Ala 2115	aac tct atc Asn Ser Ile	6474
aaa gta Lys Val 2120	tct gtt tct tcg gga Ser Val Ser Ser Gly 2125	ggt gac tgt gtt cgg Gly Asp Cys Val Arg 2130	aca tac agg Thr Tyr Arg	6519
cca gaa Pro Glu 2135	atc aag aaa gga agc Ile Lys Lys Gly Ser 2140	tac aat aac atc gtt Tyr Asn Asn Ile Val 2145	gtc cat gtc Val His Val	6564
aag acc Lys Thr 2150	gct gtt gcc gac aac Ala Val Ala Asp Asn 2155	ctc ctt ttt tat ctt Leu Leu Phe Tyr Leu 2160	gga agt gcc Gly Ser Ala	6609

aaa ttt Lys Phe 2165	att gac ttt ctt gct Ile Asp Phe Leu Ala 2170	ata gaa atg cgc aaa Ile Glu Met Arg Lys 2175	ggc aaa gtc Gly Lys Val	6654
agc ttc Ser Phe 2180	ctc tgg att gtt ggc Leu Trp Ile Val Gly 2185	tct gga gtt ggc cga Ser Gly Val Gly Arg 2190	gta ggg ttt Val Gly Phe	6699
cca gac Pro Asp 2195	ttg acc atc gac gac Leu Thr Ile Asp Asp 2200	tcc tat tgg tac cgt Ser Tyr Trp Tyr Arg 2205	att gaa gca Ile Glu Ala	6744
tca aga Ser Arg 2210	acg gga aga aat gga Thr Gly Arg Asn Gly 2215	tct att tct gtg aga Ser Ile Ser Val Arg 2220	gct tta gat Ala Leu Asp	6789
gga ccc Gly Pro 2225	aaa gcc agt atg gta Lys Ala Ser Met Val 2230	ccc agc acc tac cat Pro Ser Thr Tyr His 2235	tca gtg tct Ser Val Ser	6834
cct ccc Pro Pro 2240	ggg tat act atc cta Gly Tyr Thr Ile Leu 2245	gat gtg gat gca aat Asp Val Asp Ala Asn 2250	gca atg ctg Ala Met Leu	6879
ttt gtt Phe Val 2255	ggt ggc ctg acc gga Gly Gly Leu Thr Gly 2260	aaa ata aag aag gcc Lys Ile Lys Lys Ala 2265	gat gct gta Asp Ala Val	6924
cgt gtg Arg Val 2270	atc acc ttc acc ggc Ile Thr Phe Thr Gly 2275	tgt atg gga gaa aca Cys Met Gly Glu Thr 2280	tac ttt gac Tyr Phe Asp	6969
aac aaa Asn Lys 2285	cct ata ggt tta tgg Pro Ile Gly Leu Trp 2290	aac ttc cgg gag aaa Asn Phe Arg Glu Lys 2295	gaa ggc gac Glu Gly Asp	7014
tgt aag Cys Lys 2300	gga tgt act gtc agc Gly Cys Thr Val Ser 2305	cca caa gtg gaa gat Pro Gln Val Glu Asp 2310	agt gag ggg Ser Glu Gly	7059
act att Thr Ile 2315	cag ttt gat ggt gaa Gln Phe Asp Gly Glu 2320	ggc tat gca tta gtg Gly Tyr Ala Leu Val 2325	agc cgg ccc Ser Arg Pro	7104
atc cgc Ile Arg 2330	tgg tac ccc aac atc Trp Tyr Pro Asn Ile 2335	tcc aca gtc atg ttc Ser Thr Val Met Phe 2340	aag ttc cgg Lys Phe Arg	7149
aca ttt	tca tca agt gct ctc	ctg atg tat ctt gcc	aca cga gac	7194

Thr Phe Ser Ser Ser Ala Leu Leu Met Tyr Leu Ala Thr Arg Asp 2345 2350 2355	
ctg aaa gat ttc atg agt gta gag ctc agt gat gga cat gtg aaa Leu Lys Asp Phe Met Ser Val Glu Leu Ser Asp Gly His Val Lys 2360 2365 2370	7239
gtc agc tat gac ctg ggc tca gga atg act tcc gtt gtc agc aat Val Ser Tyr Asp Leu Gly Ser Gly Met Thr Ser Val Val Ser Asn 2375 2380 2385	7284
caa aac cat aat gat ggg aaa tgg aaa gca ttc acg ctg tcg cgg Gln Asn His Asn Asp Gly Lys Trp Lys Ala Phe Thr Leu Ser Arg 2390 2395 2400	7329
att cag aaa caa gcc aac ata tcg att gtc gac atc gat tct aac Ile Gln Lys Gln Ala Asn Ile Ser Ile Val Asp Ile Asp Ser Asn 2405 2410 2415	7374
cag gag gag aat gta gct act tca tct tct gga aac aac ttt ggt Gln Glu Glu Asn Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Asn Asn Phe Gly 2420 2425 2430	7419
ctt gac ttg aaa gca gat gac aaa ata tat ttt ggt ggc ctg cca Leu Asp Leu Lys Ala Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Gly Gly Leu Pro 2435 2440 2445	7464
act ctg aga aac ttg agt atg aaa gca agg cca gaa gtc aat gtg Thr Leu Arg Asn Leu Ser Met Lys Ala Arg Pro Glu Val Asn Val 2450 2455 2460	7509
aag aaa tac tcc ggc tgc ctc aaa gat att gaa att tca aga aca Lys Lys Tyr Ser Gly Cys Leu Lys Asp Ile Glu Ile Ser Arg Thr 2465 2470 2475	7554
cct tac aat ata ctc agc agc cct gat tat gtt ggt gtg acc aaa Pro Tyr Asn Ile Leu Ser Ser Pro Asp Tyr Val Gly Val Thr Lys 2480 2485 2490	7599
ggc tgt tca ctg gag aat gtt aat aca gtt agt ttc ccc aag cct Gly Cys Ser Leu Glu Asn Val Asn Thr Val Ser Phe Pro Lys Pro 2495 2500 2505	7644
ggt ttt gtg gag ctt gcc gct gtg tct att gat gtt gga aca gaa Gly Phe Val Glu Leu Ala Ala Val Ser Ile Asp Val Gly Thr Glu 2510 2515 2520	7689
atc aat ctg tcc ttt agt acc agg aac gag tct ggg atc att ctc Ile Asn Leu Ser Phe Ser Thr Arg Asn Glu Ser Gly Ile Ile Leu 2525 2530 2535	7734



ttg gga Leu Gly 2540	agt gga ggg aca ctc Ser Gly Gly Thr Leu 2545	aca cca ccc agg aga Thr Pro Pro Arg Arg 2550	aaa cgg aga Lys Arg Arg	7779
caa acc Gln Thr 2555	aca cag gct tat tat Thr Gln Ala Tyr Tyr 2560	gcc ata ttc ctc aac Ala Ile Phe Leu Asn 2565	aag ggc cgc Lys Gly Arg	7824
ttg gaa Leu Glu 2570	gtg cat ctc tcc tcg Val His Leu Ser Ser 2575	ggg aca cgg aca atg Gly Thr Arg Thr Met 2580	agg aaa att Arg Lys Ile	7869
gtc atc Val Ile 2585	aaa ccg gag cca aat Lys Pro Glu Pro Asn 2590	ttg ttt cat gat ggg Leu Phe His Asp Gly 2595	aga gaa cat Arg Glu His	7914
tct gtc Ser Val 2600	cac gta gaa aga acc His Val Glu Arg Thr 2605	aga ggc atc ttc act Arg Gly Ile Phe Thr 2610	gtt caa att Val Gln Ile	7959
gat gaa Asp Glu 2615	gac aga aga cat atc Asp Arg Arg His Ile 2620	caa aac ctg aca gag Gln Asn Leu Thr Glu 2625	gaa cag ccc Glu Gln Pro	8004
atc gaa Ile Glu 2630	gtg aaa aag ctc ttt Val Lys Lys Leu Phe 2635	gtc ggg ggt gct cct Val Gly Gly Ala Pro 2640	cct gaa ttt Pro Glu Phe	8049
cag ccc Gln Pro 2645	tcc cca ctc agg aat Ser Pro Leu Arg Asn 2650	att ccg gcc ttt caa Ile Pro Ala Phe Gln 2655	ggc tgt gtg Gly Cys Val	8094
tgg aac Trp Asn 2660	ctt gtt att aac tcc Leu Val Ile Asn Ser 2665	atc ccc atg gac ttt Ile Pro Met Asp Phe 2670	gcg cag cct Ala Gln Pro	8139
ata gcc Ile Ala 2675	ttc aaa aat gcc gac Phe Lys Asn Ala Asp 2680	att ggt cgc tgt acc Ile Gly Arg Cys Thr 2685	tat caa aag Tyr Gln Lys	8184
ccc cgg Pro Arg 2690	gaa gat gag agt gaa Glu Asp Glu Ser Glu 2695	gca gtt cca gct gaa Ala Val Pro Ala Glu 2700	gtt att gtc Val Ile Val	8229
cag cct Gln Pro 2705	cag tcg gtg ccc acc Gln Ser Val Pro Thr 2710	cct gcc ttc cct ttc Pro Ala Phe Pro Phe 2715	cca gtc ccc Pro Val Pro	8274
acc atg 2720	gtg cat ggc cct tgt 2725	gtt gca gaa tca gaa 2730	cca gct ctt 2735	8319

Thr Met	Val His Gly Pro Cys	Val Ala Glu Ser Glu	Pro Ala Leu	
2720	2725	2730		
ctg aca	ggg agc aag cag ttt	ggg ctt tcc aga aac	agc cac att	8364
Leu Thr	Gly Ser Lys Gln Phe	Gly Leu Ser Arg Asn	Ser His Ile	
2735	2740	2745		
gca att	gtc ttt gat gac acc	aaa gtt aaa aac cgc	ctc acc att	8409
Ala Ile	Val Phe Asp Asp Thr	Lys Val Lys Asn Arg	Leu Thr Ile	
2750	2755	2760		
gag ctg	gag gta cga act gaa	gct gaa tca ggc ttg	ctc ttc tac	8454
Glu Leu	Glu Val Arg Thr Glu	Ala Glu Ser Gly Leu	Leu Phe Tyr	
2765	2770	2775		
atg ggt	cgg atc aat cat gct	gat ttt ggt act gtt	cag ctg agg	8499
Met Gly	Arg Ile Asn His Ala	Asp Phe Gly Thr Val	Gln Leu Arg	
2780	2785	2790		
aat ggg	ttc ccg ttc ttc agt	tat gat ttg ggg agt	ggg agc acc	8544
Asn Gly	Phe Pro Phe Phe Ser	Tyr Asp Leu Gly Ser	Gly Ser Thr	
2795	2800	2805		
aga acc	atg atc ccc aca aaa	atc aac gat ggt cag	tgg cac aag	8589
Arg Thr	Met Ile Pro Thr Lys	Ile Asn Asp Gly Gln	Trp His Lys	
2810	2815	2820		
att aag	att gtg aga gtg aag	cag gag gga att ctt	tat gtg gat	8634
Ile Lys	Ile Val Arg Val Lys	Gln Glu Gly Ile Leu	Tyr Val Asp	
2825	2830	2835		
gat gcc	tcc agc caa acc atc	agt ccc aag aaa gcc	gac atc ctg	8679
Asp Ala	Ser Ser Gln Thr Ile	Ser Pro Lys Lys Ala	Asp Ile Leu	
2840	2845	2850		
gat gtc	ggg ggg att ctg tat	gtc ggt gga ttg ccg	atc aac tat	8724
Asp Val	Gly Gly Ile Leu Tyr	Val Gly Gly Leu Pro	Ile Asn Tyr	
2855	2860	2865		
acc aca	cgc aga att ggt cca	gtg act tac agc ctg	gat ggc tgt	8769
Thr Thr	Arg Arg Ile Gly Pro	Val Thr Tyr Ser Leu	Asp Gly Cys	
2870	2875	2880		
gtt agg	aat ctt cac atg gaa	caa gcc cct gtt gat	ctg gac cag	8814
Val Arg	Asn Leu His Met Glu	Gln Ala Pro Val Asp	Leu Asp Gln	
2885	2890	2895		
cct acc	tcc agc ttt cac gtt	ggg aca tgc ttt gcg	aat gca gag	8859
Pro Thr	Ser Ser Phe His Val	Gly Thr Cys Phe Ala	Asn Ala Glu	
2900	2905	2910		

agt ggg act tac ttt gat gga acc ggt ttt ggt aaa gca gtt ggt 8904  
 Ser Gly Thr Tyr Phe Asp Gly Thr Gly Phe Gly Lys Ala Val Gly  
 2915 2920 2925

ggg ttc atc gtt gga ttg gac ctt ctt gtg gaa ttt gaa ttc cgt 8949  
 Gly Phe Ile Val Gly Leu Asp Leu Leu Val Glu Phe Glu Phe Arg  
 2930 2935 2940

acc aca aga ccc act ggg gtc ctc ctg ggg atc agc agt cag aag 8994  
 Thr Thr Arg Pro Thr Gly Val Leu Leu Gly Ile Ser Ser Gln Lys  
 2945 2950 2955

atg gat gga atg ggt att gaa atg atc gac gag aag ctt atg ttc 9039  
 Met Asp Gly Met Gly Ile Glu Met Ile Asp Glu Lys Leu Met Phe  
 2960 2965 2970

cac gtg gat aat ggc gct ggc cga ttc act gca att tat gat gct 9084  
 His Val Asp Asn Gly Ala Gly Arg Phe Thr Ala Ile Tyr Asp Ala  
 2975 2980 2985

gag atc cca ggc cac atg tgc aat gga cag tgg tat aaa gtc act 9129  
 Glu Ile Pro Gly His Met Cys Asn Gly Gln Trp Tyr Lys Val Thr  
 2990 2995 3000

gcc aag aag atc aaa aac cgt ctt gag ctg gtg gta gat ggg aac 9174  
 Ala Lys Lys Ile Lys Asn Arg Leu Glu Leu Val Val Asp Gly Asn  
 3005 3010 3015

cag gtg gat gcc cag agc cca aac tca gca tcg aca tca gct gat 9219  
 Gln Val Asp Ala Gln Ser Pro Asn Ser Ala Ser Thr Ser Ala Asp  
 3020 3025 3030

aca aac gac cct gtt ttc gtt ggc ggt ttc cca ggt ggc ctc aat 9264  
 Thr Asn Asp Pro Val Phe Val Gly Gly Phe Pro Gly Gly Leu Asn  
 3035 3040 3045

cag ttt ggc ctg acc acc aac att agg ttc cga ggc tgc atc cga 9309  
 Gln Phe Gly Leu Thr Thr Asn Ile Arg Phe Arg Gly Cys Ile Arg  
 3050 3055 3060

tct ctg aag ctc acc aaa ggc act gca aac cgc tgg agg tta att 9354  
 Ser Leu Lys Leu Thr Lys Gly Thr Ala Asn Arg Trp Arg Leu Ile  
 3065 3070 3075

ttg cca agg ccc tgg aac tgaggggtgt tcaacctgta tcatgcccga 9402  
 Leu Pro Arg Pro Trp Asn  
 3080

ctacctaata aagatagttc aatcctgagg agaattcatc aaaacaagta tatcaagtta 9462

aacaatatac actcctatca tattaataaa actaatgtgc agcgccgc

9511

<210> 6  
 <211> 3084  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 6

Gln Arg Arg Gln Ser Gln Ala His Gln Gln Arg Gly Leu Phe Pro Ala  
 1 5 10 15

Val Leu Asn Leu Ala Ser Asn Ala Leu Ile Thr Thr Asn Ala Thr Cys  
 20 25 30

Gly Glu Lys Gly Pro Glu Met Tyr Cys Lys Leu Val Glu His Val Pro  
 35 40 45

Gly Gln Pro Val Arg Asn Pro Gln Cys Arg Ile Cys Asn Gln Asn Ser  
 50 55 60

Ser Asn Pro Tyr Gln Arg His Pro Ile Thr Asn Ala Ile Asp Gly Lys  
 65 70 75 80

Asn Thr Trp Trp Gln Ser Pro Ser Ile Lys Asn Gly Val Glu Tyr His  
 85 90 95

Tyr Val Thr Ile Thr Leu Asp Leu Gln Gln Val Phe Gln Ile Ala Tyr  
 100 105 110

Val Ile Val Lys Ala Ala Asn Ser Pro Arg Pro Gly Asn Trp Ile Leu  
 115 120 125

Glu Arg Ser Leu Asp Asp Val Glu Tyr Lys Pro Trp Gln Tyr His Ala  
 130 135 140

Val Thr Asp Thr Glu Cys Leu Thr Leu Tyr Asn Ile Tyr Pro Arg Thr  
 145 150 155 160

Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Lys Asp Asp Glu Val Ile Cys Thr Ser Phe  
165 170 175

Tyr Ser Lys Ile His Pro Leu Glu Asn Gly Glu Ile His Ile Ser Leu  
180 185 190

Ile Asn Gly Arg Pro Ser Ala Asp Asp Pro Ser Pro Glu Leu Leu Glu  
195 200 205

Phe Thr Ser Ala Arg Tyr Ile Arg Leu Arg Phe Gln Arg Ile Arg Thr  
210 215 220

Leu Asn Ala Asp Leu Met Met Phe Ala His Lys Asp Pro Arg Glu Ile  
225 230 235 240

Asp Pro Ile Val Thr Arg Arg Tyr Tyr Tyr Ser Val Lys Asp Ile Ser  
245 250 255

Val Gly Gly Met Cys Ile Cys Tyr Gly His Ala Arg Ala Cys Pro Leu  
260 265 270

Asp Pro Ala Thr Asn Lys Ser Arg Cys Glu Cys Glu His Asn Thr Cys  
275 280 285

Gly Glu Ser Cys Asp Arg Cys Cys Pro Gly Phe His Gln Lys Pro Trp  
290 295 300

Arg Ala Gly Thr Phe Leu Thr Lys Ser Glu Cys Glu Ala Cys Asn Cys  
305 310 315 320

His Gly Lys Ala Glu Glu Cys Tyr Tyr Asp Glu Thr Val Ala Ser Arg  
325 330 335

Asn Leu Ser Leu Asn Ile His Gly Lys Tyr Ile Gly Gly Gly Val Cys  
340 345 350

Ile Asn Cys Thr His Asn Thr Ala Gly Ile Asn Cys Glu Thr Cys Val

355

360

365

Asp Gly Phe Phe Arg Pro Lys Gly Val Ser Pro Asn Tyr Pro Arg Pro  
 370 375 380

Cys Gln Pro Cys His Cys Asp Pro Thr Gly Ser Leu Ser Glu Val Cys  
 385 390 395 400

Val Lys Asp Glu Lys Tyr Ala Gln Arg Gly Leu Lys Pro Gly Ser Cys  
 405 410 415

His Cys Lys Thr Gly Phe Gly Gly Val Asn Cys Asp Arg Cys Val Arg  
 420 425 430

Gly Tyr His Gly Tyr Pro Asp Cys Gln Pro Cys Asn Cys Ser Gly Leu  
 435 440 445

Gly Ser Thr Asn Glu Asp Pro Cys Val Gly Pro Cys Ser Cys Lys Glu  
 450 455 460

Asn Val Glu Gly Glu Asp Cys Ser Arg Cys Lys Ser Gly Phe Phe Asn  
 465 470 475 480

Leu Gln Glu Asp Asn Gln Lys Gly Cys Glu Glu Cys Phe Cys Ser Gly  
 485 490 495

Val Ser Asn Arg Cys Gln Ser Ser Tyr Trp Thr Tyr Gly Asn Ile Gln  
 500 505 510

Asp Met Arg Gly Trp Tyr Leu Thr Asp Leu Ser Gly Arg Ile Arg Met  
 515 520 525

Ala Pro Gln Leu Asp Asn Pro Asp Ser Pro Gln Gln Ile Ser Ile Ser  
 530 535 540

Asn Ser Glu Ala Arg Lys Ser Leu Leu Asp Gly Tyr Tyr Trp Ser Ala  
 545 550 555 560

Pro Pro Pro Tyr Leu Gly Asn Arg Leu Pro Ala Val Gly Gly Gln Leu  
565 570 575

Ser Phe Thr Ile Ser Tyr Asp Leu Glu Glu Glu Asp Asp Thr Glu  
580 585 590

Lys Leu Leu Gln Leu Met Ile Ile Phe Glu Gly Asn Asp Leu Arg Ile  
595 600 605

Ser Thr Ala Tyr Lys Glu Val Tyr Leu Glu Pro Ser Glu Glu His Val  
610 615 620

Glu Glu Val Ser Leu Lys Glu Glu Ala Phe Thr Ile His Gly Thr Asn  
625 630 635 640

Leu Pro Val Thr Arg Lys Asp Phe Met Ile Val Leu Thr Asn Leu Gly  
645 650 655

Glu Ile Leu Ile Gln Ile Thr Tyr Asn Leu Gly Met Asp Ala Ile Phe  
660 665 670

Arg Leu Ser Ser Val Asn Leu Glu Ser Pro Val Pro Tyr Pro Thr Asp  
675 680 685

Arg Arg Ile Ala Thr Asp Val Glu Val Cys Gln Cys Pro Pro Gly Tyr  
690 695 700

Ser Gly Ser Ser Cys Glu Thr Cys Trp Pro Arg His Arg Arg Val Asn  
705 710 715 720

Gly Thr Ile Phe Gly Gly Ile Cys Glu Pro Cys Gln Cys Phe Ala His  
725 730 735

Ala Glu Ala Cys Asp Asp Ile Thr Gly Glu Cys Leu Asn Cys Lys Asp  
740 745 750

His Thr Gly Gly Pro Tyr Cys Asn Glu Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Gly



755

760

765

Asp Pro Thr Arg Gly Ser Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala Cys Pro  
770 775 780

Leu Asn Ile Pro Ser Asn Asn Phe Ser Pro Thr Cys His Leu Asp Arg  
785 790 795 800

Ser Leu Gly Leu Ile Cys Asp Glu Cys Pro Ile Gly Tyr Thr Gly Pro  
805 810 815

Arg Cys Glu Arg Cys Ala Glu Gly Tyr Phe Gly Gln Pro Ser Val Pro  
820 825 830

Gly Gly Ser Cys Gln Pro Cys Gln Cys Asn Asp Asn Leu Asp Tyr Ser  
835 840 845

Ile Pro Gly Ser Cys Asp Ser Leu Ser Gly Ser Cys Leu Ile Cys Lys  
850 855 860

Pro Gly Thr Thr Gly Arg Tyr Cys Glu Leu Cys Ala Asp Gly Tyr Phe  
865 870 875 880

Gly Asp Ala Val Asn Thr Lys Asn Cys Gln Pro Cys Arg Cys Asp Ile  
885 890 895

Asn Gly Ser Phe Ser Glu Asp Cys His Thr Arg Thr Gly Gln Cys Glu  
900 905 910

Cys Arg Pro Asn Val Gln Gly Arg His Cys Asp Glu Cys Lys Pro Glu  
915 920 925

Thr Phe Gly Leu Gln Leu Gly Arg Gly Cys Leu Pro Cys Asn Cys Asn  
930 935 940

Ser Phe Gly Ser Lys Ser Phe Asp Cys Glu Ala Ser Gly Gln Cys Trp  
945 950 955 960

Cys Gln Pro Gly Val Ala Gly Lys Lys Cys Asp Arg Cys Ala His Gly  
965 970 975

Tyr Phe Asn Phe Gln Glu Gly Gly Cys Ile Ala Cys Asp Cys Ser His  
980 985 990

Leu Gly Asn Asn Cys Asp Pro Lys Thr Gly Gln Cys Ile Cys Pro Pro  
995 1000 1005

Asn Thr Thr Gly Glu Lys Cys Ser Glu Cys Leu Pro Asn Thr Trp  
1010 1015 1020

Gly His Ser Ile Val Thr Gly Cys Lys Val Cys Asn Cys Ser Thr  
1025 1030 1035

Val Gly Ser Leu Ala Ser Gln Cys Asn Val Asn Thr Gly Gln Cys  
1040 1045 1050

Ser Cys His Pro Lys Phe Ser Gly Met Lys Cys Ser Glu Cys Ser  
1055 1060 1065

Arg Gly His Trp Asn Tyr Pro Leu Cys Thr Leu Cys Asp Cys Phe  
1070 1075 1080

Leu Pro Gly Thr Asp Ala Thr Thr Cys Asp Leu Glu Thr Arg Lys  
1085 1090 1095

Cys Ser Cys Ser Asp Gln Thr Gly Gln Cys Ser Cys Lys Val Asn  
1100 1105 1110

Val Glu Gly Val His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Lys Phe Gly  
1115 1120 1125

Leu Asp Ala Lys Asn Pro Leu Gly Cys Ser Ser Cys Tyr Cys Phe  
1130 1135 1140

Gly Val Thr Ser Gln Cys Ser Glu Ala Lys Gly Leu Ile Arg Thr  
1145 1150 1155

Trp Val Thr Leu Ser Asp Glu Gln Thr Ile Leu Pro Leu Val Asp  
1160 1165 1170

Glu Ala Leu Gln His Thr Thr Thr Lys Gly Ile Ala Phe Gln Lys  
1175 1180 1185

Pro Glu Ile Val Ala Lys Met Asp Glu Val Arg Gln Glu Leu His  
1190 1195 1200

Leu Glu Pro Phe Tyr Trp Lys Leu Pro Gln Gln Phe Glu Gly Lys  
1205 1210 1215

Lys Leu Met Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Lys Tyr Ala Ile Tyr Phe  
1220 1225 1230

Glu Ala Arg Asp Glu Thr Gly Phe Ala Thr Tyr Lys Pro Gln Val  
1235 1240 1245

Ile Ile Arg Gly Gly Thr Pro Thr His Ala Arg Ile Ile Thr Arg  
1250 1255 1260

His Met Ala Ala Pro Leu Ile Gly Gln Leu Thr Arg His Glu Ile  
1265 1270 1275

Glu Met Thr Glu Lys Glu Trp Lys Tyr Tyr Gly Asp Asp Pro Arg  
1280 1285 1290

Ile Ser Arg Thr Val Thr Arg Glu Asp Phe Leu Asp Ile Leu Tyr  
1295 1300 1305

Asp Ile His Tyr Ile Leu Ile Lys Ala Thr Tyr Gly Asn Val Val  
1310 1315 1320

Arg Gln Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ser Met Glu Val Ala Glu Pro  
1325 1330 1335

Gly His Val Leu Ala Gly Ser Pro Pro Ala His Leu Ile Glu Arg  
1340 1345 1350

Cys Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Cys Glu Thr Cys  
1355 1360 1365

Ala Pro Gly Phe Tyr Arg Leu Arg Ser Glu Pro Gly Gly Arg Thr  
1370 1375 1380

Pro Gly Pro Thr Leu Gly Thr Cys Val Pro Cys Gln Cys Asn Gly  
1385 1390 1395

His Ser Ser Gln Cys Asp Pro Glu Thr Ser Val Cys Gln Asn Cys  
1400 1405 1410

Gln His His Thr Ala Gly Asp Phe Cys Glu Arg Cys Ala Leu Gly  
1415 1420 1425

Tyr Tyr Gly Ile Val Arg Gly Leu Pro Asn Asp Cys Gln Pro Cys  
1430 1435 1440

Ala Cys Pro Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asn Phe Ser Pro Ser Cys  
1445 1450 1455

Val Leu Glu Gly Leu Glu Asp Tyr Arg Cys Thr Ala Cys Pro Arg  
1460 1465 1470

Gly Tyr Glu Gly Gln Tyr Cys Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Thr  
1475 1480 1485

Gly Ser Pro Ser Ser Pro Gly Gly Ser Cys Gln Glu Cys Glu Cys  
1490 1495 1500

Asp Pro Tyr Gly Ser Leu Pro Val Pro Cys Asp Arg Val Thr Gly  
1505 1510 1515

Leu Cys Thr Cys Arg Pro Gly Ala Thr Gly Arg Lys Cys Asp Gly  
1520 1525 1530

Cys Glu His Trp His Ala Arg Glu Gly Ala Glu Cys Val Phe Cys  
1535 1540 1545

Gly Asp Glu Cys Thr Gly Leu Leu Leu Gly Asp Leu Ala Arg Leu  
1550 1555 1560

Glu Gln Met Thr Met Asn Ile Asn Leu Thr Gly Pro Leu Pro Ala  
1565 1570 1575

Pro Tyr Lys Ile Leu Tyr Gly Leu Glu Asn Thr Thr Gln Glu Leu  
1580 1585 1590

Lys His Leu Leu Ser Pro Gln Arg Ala Pro Glu Arg Leu Ile Gln  
1595 1600 1605

Leu Ala Glu Gly Asn Val Asn Thr Leu Val Met Glu Thr Asn Glu  
1610 1615 1620

Leu Leu Thr Arg Ala Thr Lys Val Thr Ala Asp Gly Glu Gln Thr  
1625 1630 1635

Gly Gln Asp Ala Glu Arg Thr Asn Ser Arg Ala Glu Ser Leu Glu  
1640 1645 1650

Glu Phe Ile Lys Gly Leu Val Gln Asp Ala Glu Ala Ile Asn Glu  
1655 1660 1665

Lys Ala Val Lys Leu Asn Glu Thr Leu Gly Asn Gln Asp Lys Thr  
1670 1675 1680

Ala Glu Arg Asn Leu Glu Glu Leu Gln Lys Glu Ile Asp Arg Met  
1685 1690 1695

Leu Lys Glu Leu Arg Ser Lys Asp Leu Gln Thr Gln Lys Glu Val  
1700 1705 1710

Ala Glu Asp Glu Leu Val Ala Ala Glu Gly Leu Leu Lys Arg Val  
1715 1720 1725

Asn Lys Leu Phe Gly Glu Pro Arg Ala Gln Asn Glu Asp Met Glu  
1730 1735 1740

Lys Asp Leu Gln Gln Lys Leu Ala Glu Tyr Lys Asn Lys Leu Asp  
1745 1750 1755

Asp Ala Trp Asp Leu Leu Arg Glu Ala Thr Asp Lys Thr Arg Asp  
1760 1765 1770

Ala Asn Arg Leu Ser Ala Ala Asn Gln Lys Asn Met Thr Ile Leu  
1775 1780 1785

Glu Thr Lys Lys Glu Ala Ile Glu Gly Ser Lys Arg Gln Ile Glu  
1790 1795 1800

Asn Thr Leu Lys Glu Gly Asn Asp Ile Leu Asp Glu Ala Asn Gln  
1805 1810 1815

Leu Leu Gly Glu Ile Asn Ser Val Ile Asp Tyr Val Asp Asp Ile  
1820 1825 1830

Lys Thr Lys Leu Pro Pro Met Ser Glu Glu Leu Ser Asp Lys Ile  
1835 1840 1845

Asp Asp Leu Ala Gln Glu Ile Lys Asp Arg Arg Leu Ala Glu Lys  
1850 1855 1860

Val Phe Gln Ala Glu Ser His Ala Ala Gln Leu Asn Asp Ser Ser  
1865 1870 1875

Ala Val Leu Asp Gly Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Ile Ser Phe  
1880 1885 1890

Asn Ala Thr Ala Ala Phe Arg Ala Tyr Ser Asn Ile Lys Asp Tyr  
1895 1900 1905

Ile Asp Glu Ala Glu Lys Val Ala Arg Glu Ala Lys Glu Leu Ala  
1910 1915 1920

Gln Gly Ala Thr Lys Leu Ala Thr Ser Pro Gln Gly Leu Leu Lys  
1925 1930 1935

Glu Asp Ala Lys Gly Ser Leu Gln Lys Ser Phe Arg Ile Leu Asn  
1940 1945 1950

Glu Ala Lys Lys Leu Ala Asn Asp Val Lys Gly Asn His Asn Asp  
1955 1960 1965

Leu Asn Asp Leu Lys Thr Arg Leu Glu Thr Ala Asp Leu Arg Asn  
1970 1975 1980

Ser Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asn Asp Thr Met Asp Lys Leu Ser  
1985 1990 1995

Ala Ile Thr Asn Asp Thr Ala Ala Lys Leu Gln Ala Val Lys Glu  
2000 2005 2010

Lys Ala Arg Glu Ala Asn Asp Thr Ala Lys Ala Val Leu Ala Gln  
2015 2020 2025

Val Lys Asp Leu His Gln Asn Leu Asp Gly Leu Lys Gln Asn Tyr  
2030 2035 2040

Asn Lys Leu Ala Asp Ser Val Ala Lys Thr Asn Ala Val Val Lys  
2045 2050 2055

Asp Pro Ser Lys Asn Lys Ile Ile Ala Asp Ala Gly Thr Ser Val  
2060 2065 2070

Arg Asn Leu Glu Gln Glu Ala Asp Arg Leu Ile Asp Lys Leu Lys  
2075 2080 2085

Pro Ile Lys Glu Leu Glu Asp Asn Leu Lys Lys Asn Ile Ser Glu  
2090 2095 2100

Ile Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ala Arg Lys Gln Ala Asn Ser Ile  
2105 2110 2115

Lys Val Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Cys Val Arg Thr Tyr Arg  
2120 2125 2130

Pro Glu Ile Lys Lys Gly Ser Tyr Asn Asn Ile Val Val His Val  
2135 2140 2145

Lys Thr Ala Val Ala Asp Asn Leu Leu Phe Tyr Leu Gly Ser Ala  
2150 2155 2160

Lys Phe Ile Asp Phe Leu Ala Ile Glu Met Arg Lys Gly Lys Val  
2165 2170 2175

Ser Phe Leu Trp Ile Val Gly Ser Gly Val Gly Arg Val Gly Phe  
2180 2185 2190

Pro Asp Leu Thr Ile Asp Asp Ser Tyr Trp Tyr Arg Ile Glu Ala  
2195 2200 2205

Ser Arg Thr Gly Arg Asn Gly Ser Ile Ser Val Arg Ala Leu Asp  
2210 2215 2220

Gly Pro Lys Ala Ser Met Val Pro Ser Thr Tyr His Ser Val Ser  
2225 2230 2235

Pro Pro Gly Tyr Thr Ile Leu Asp Val Asp Ala Asn Ala Met Leu  
2240 2245 2250

Phe Val Gly Gly Leu Thr Gly Lys Ile Lys Lys Ala Asp Ala Val  
2255 2260 2265



Arg Val Ile Thr Phe Thr Gly Cys Met Gly Glu Thr Tyr Phe Asp  
 2270 2275 2280

Asn Lys Pro Ile Gly Leu Trp Asn Phe Arg Glu Lys Glu Gly Asp  
 2285 2290 2295

Cys Lys Gly Cys Thr Val Ser Pro Gln Val Glu Asp Ser Glu Gly  
 2300 2305 2310

Thr Ile Gln Phe Asp Gly Glu Gly Tyr Ala Leu Val Ser Arg Pro  
 2315 2320 2325

Ile Arg Trp Tyr Pro Asn Ile Ser Thr Val Met Phe Lys Phe Arg  
 2330 2335 2340

Thr Phe Ser Ser Ser Ala Leu Leu Met Tyr Leu Ala Thr Arg Asp  
 2345 2350 2355

Leu Lys Asp Phe Met Ser Val Glu Leu Ser Asp Gly His Val Lys  
 2360 2365 2370

Val Ser Tyr Asp Leu Gly Ser Gly Met Thr Ser Val Val Ser Asn  
 2375 2380 2385

Gln Asn His Asn Asp Gly Lys Trp Lys Ala Phe Thr Leu Ser Arg  
 2390 2395 2400

Ile Gln Lys Gln Ala Asn Ile Ser Ile Val Asp Ile Asp Ser Asn  
 2405 2410 2415

Gln Glu Glu Asn Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Asn Asn Phe Gly  
 2420 2425 2430

Leu Asp Leu Lys Ala Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Gly Gly Leu Pro  
 2435 2440 2445

Thr Leu Arg Asn Leu Ser Met Lys Ala Arg Pro Glu Val Asn Val  
 2450 2455 2460

Lys Lys Tyr Ser Gly Cys Leu Lys Asp Ile Glu Ile Ser Arg Thr  
2465 2470 2475

Pro Tyr Asn Ile Leu Ser Ser Pro Asp Tyr Val Gly Val Thr Lys  
2480 2485 2490

Gly Cys Ser Leu Glu Asn Val Asn Thr Val Ser Phe Pro Lys Pro  
2495 2500 2505

Gly Phe Val Glu Leu Ala Ala Val Ser Ile Asp Val Gly Thr Glu  
2510 2515 2520

Ile Asn Leu Ser Phe Ser Thr Arg Asn Glu Ser Gly Ile Ile Leu  
2525 2530 2535

Leu Gly Ser Gly Gly Thr Leu Thr Pro Pro Arg Arg Lys Arg Arg  
2540 2545 2550

Gln Thr Thr Gln Ala Tyr Tyr Ala Ile Phe Leu Asn Lys Gly Arg  
2555 2560 2565

Leu Glu Val His Leu Ser Ser Gly Thr Arg Thr Met Arg Lys Ile  
2570 2575 2580

Val Ile Lys Pro Glu Pro Asn Leu Phe His Asp Gly Arg Glu His  
2585 2590 2595

Ser Val His Val Glu Arg Thr Arg Gly Ile Phe Thr Val Gln Ile  
2600 2605 2610

Asp Glu Asp Arg Arg His Ile Gln Asn Leu Thr Glu Glu Gln Pro  
2615 2620 2625

Ile Glu Val Lys Lys Leu Phe Val Gly Gly Ala Pro Pro Glu Phe  
2630 2635 2640

Gln Pro Ser Pro Leu Arg Asn Ile Pro Ala Phe Gln Gly Cys Val  
 2645 2650 2655

Trp Asn Leu Val Ile Asn Ser Ile Pro Met Asp Phe Ala Gln Pro  
 2660 2665 2670

Ile Ala Phe Lys Asn Ala Asp Ile Gly Arg Cys Thr Tyr Gln Lys  
 2675 2680 2685

Pro Arg Glu Asp Glu Ser Glu Ala Val Pro Ala Glu Val Ile Val  
 2690 2695 2700

Gln Pro Gln Ser Val Pro Thr Pro Ala Phe Pro Phe Pro Val Pro  
 2705 2710 2715

Thr Met Val His Gly Pro Cys Val Ala Glu Ser Glu Pro Ala Leu  
 2720 2725 2730

Leu Thr Gly Ser Lys Gln Phe Gly Leu Ser Arg Asn Ser His Ile  
 2735 2740 2745

Ala Ile Val Phe Asp Asp Thr Lys Val Lys Asn Arg Leu Thr Ile  
 2750 2755 2760

Glu Leu Glu Val Arg Thr Glu Ala Glu Ser Gly Leu Leu Phe Tyr  
 2765 2770 2775

Met Gly Arg Ile Asn His Ala Asp Phe Gly Thr Val Gln Leu Arg  
 2780 2785 2790

Asn Gly Phe Pro Phe Phe Ser Tyr Asp Leu Gly Ser Gly Ser Thr  
 2795 2800 2805

Arg Thr Met Ile Pro Thr Lys Ile Asn Asp Gly Gln Trp His Lys  
 2810 2815 2820

Ile Lys Ile Val Arg Val Lys Gln Glu Gly Ile Leu Tyr Val Asp  
 2825 2830 2835

Asp Ala Ser Ser Gln Thr Ile Ser Pro Lys Lys Ala Asp Ile Leu  
2840 2845 2850

Asp Val Gly Gly Ile Leu Tyr Val Gly Gly Leu Pro Ile Asn Tyr  
2855 2860 2865

Thr Thr Arg Arg Ile Gly Pro Val Thr Tyr Ser Leu Asp Gly Cys  
2870 2875 2880

Val Arg Asn Leu His Met Glu Gln Ala Pro Val Asp Leu Asp Gln  
2885 2890 2895

Pro Thr Ser Ser Phe His Val Gly Thr Cys Phe Ala Asn Ala Glu  
2900 2905 2910

Ser Gly Thr Tyr Phe Asp Gly Thr Gly Phe Gly Lys Ala Val Gly  
2915 2920 2925

Gly Phe Ile Val Gly Leu Asp Leu Leu Val Glu Phe Glu Phe Arg  
2930 2935 2940

Thr Thr Arg Pro Thr Gly Val Leu Leu Gly Ile Ser Ser Gln Lys  
2945 2950 2955

Met Asp Gly Met Gly Ile Glu Met Ile Asp Glu Lys Leu Met Phe  
2960 2965 2970

His Val Asp Asn Gly Ala Gly Arg Phe Thr Ala Ile Tyr Asp Ala  
2975 2980 2985

Glu Ile Pro Gly His Met Cys Asn Gly Gln Trp Tyr Lys Val Thr  
2990 2995 3000

Ala Lys Lys Ile Lys Asn Arg Leu Glu Leu Val Val Asp Gly Asn  
3005 3010 3015

Gln Val Asp Ala Gln Ser Pro Asn Ser Ala Ser Thr Ser Ala Asp  
3020 3025 3030

Thr Asn Asp Pro Val Phe Val Gly Gly Phe Pro Gly Gly Leu Asn  
3035 3040 3045

Gln Phe Gly Leu Thr Thr Asn Ile Arg Phe Arg Gly Cys Ile Arg  
3050 3055 3060

Ser Leu Lys Leu Thr Lys Gly Thr Ala Asn Arg Trp Arg Leu Ile  
3065 3070 3075

Leu Pro Arg Pro Trp Asn  
3080

<210> 7  
<211> 5583  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (42)..(5441)  
<223> laminin, beta 2

<400> 7  
ccacgcgtcc gggacaccag cccagtaccc acacggtcgg g atg gag tgg gcc tca 56  
Met Glu Trp Ala Ser  
1 5

gga gaa cca ggg agg ggc agg cag gga cag cct ttg cca tgg gaa ctt 104  
Gly Glu Pro Gly Arg Gly Arg Gln Gly Gln Pro Leu Pro Trp Glu Leu  
10 15 20

cgc ttg ggc cta ctt cta agt gtg ctg gct gcc aca ttg gcc cag gcc 152  
Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala Thr Leu Ala Gln Ala  
25 30 35

ccg tcc ttg gat gta cct ggc tgt tct cga gga agc tgc tat cca gcc 200  
Pro Ser Leu Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly Ser Cys Tyr Pro Ala  
40 45 50

acc ggt gac ctg ttg gtg ggc cgt gcg gac aga ctg acg gcc tca tcc 248

Thr	Gly	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Arg	Ala	Asp	Arg	Leu	Thr	Ala	Ser	Ser	
55						60					65					
acg	tgt	ggc	ttg	cat	agc	cct	caa	ccc	tac	tgt	att	gtc	agt	cac	ctg	296
Thr	Cys	Gly	Leu	His	Ser	Pro	Gln	Pro	Tyr	Cys	Ile	Val	Ser	His	Leu	
70					75				80						85	
cag	gac	gaa	aag	aag	tgt	ttc	ctg	tgt	gac	tcc	cga	cgt	ccc	ttc	tct	344
Gln	Asp	Glu	Lys	Lys	Cys	Phe	Leu	Cys	Asp	Ser	Arg	Arg	Pro	Phe	Ser	
				90					95					100		
gct	cga	gac	aac	cca	aat	agt	cat	cgg	atc	cag	aat	gta	gtc	acc	agc	392
Ala	Arg	Asp	Asn	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Ile	Gln	Asn	Val	Val	Thr	Ser	
			105					110					115			
ttt	gcg	cca	caa	cgc	cgg	acg	gcc	tgg	tgg	caa	tcg	gag	aac	ggg	gtt	440
Phe	Ala	Pro	Gln	Arg	Arg	Thr	Ala	Trp	Trp	Gln	Ser	Glu	Asn	Gly	Val	
		120					125					130				
cca	atg	gtc	acc	atc	caa	ctg	gac	ctg	gaa	gct	gag	ttt	cat	ttc	acc	488
Pro	Met	Val	Thr	Ile	Gln	Leu	Asp	Leu	Glu	Ala	Glu	Phe	His	Phe	Thr	
	135					140					145					
cac	ctc	att	atg	acg	ttc	aag	acg	ttc	cgg	cct	gct	gct	atg	ctg	gtg	536
His	Leu	Ile	Met	Thr	Phe	Lys	Thr	Phe	Arg	Pro	Ala	Ala	Met	Leu	Val	
150					155				160					165		
gag	cgt	tct	gca	gac	ttt	ggc	cgc	acc	tgg	cac	gtg	tac	cga	tat	ttt	584
Glu	Arg	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Arg	Thr	Trp	His	Val	Tyr	Arg	Tyr	Phe	
				170					175					180		
tcc	tat	gac	tgc	ggg	gct	gac	ttc	ccg	gga	atc	cca	ctg	gcc	ccg	cca	632
Ser	Tyr	Asp	Cys	Gly	Ala	Asp	Phe	Pro	Gly	Ile	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	
			185					190					195			
cgt	cgc	tgg	gat	gat	gta	gtg	tgt	gag	tcc	cgc	tac	tca	gaa	atc	gag	680
Arg	Arg	Trp	Asp	Asp	Val	Val	Cys	Glu	Ser	Arg	Tyr	Ser	Glu	Ile	Glu	
		200					205					210				
ccg	tct	acg	gaa	ggc	gag	gtc	atc	tat	cgt	gtg	ctg	gac	cct	gct	att	728
Pro	Ser	Thr	Glu	Gly	Glu	Val	Ile	Tyr	Arg	Val	Leu	Asp	Pro	Ala	Ile	
		215				220					225					
cct	atc	cca	gac	ccc	tac	agc	tca	cgg	att	cag	aac	ctg	ttg	aag	atc	776
Pro	Ile	Pro	Asp	Pro	Tyr	Ser	Ser	Arg	Ile	Gln	Asn	Leu	Leu	Lys	Ile	
230					235				240					245		
acc	aac	cta	cga	gtg	aac	tta	acc	cgg	ctt	cac	aca	ctg	gga	gac	aac	824
Thr	Asn	Leu	Arg	Val	Asn	Leu	Thr	Arg	Leu	His	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	
				250				255						260		

ttg ctt gac cca cgg agg gag atc cgg gaa aaa tac tat tat gct ctc Leu Leu Asp Pro Arg Arg Glu Ile Arg Glu Lys Tyr Tyr Tyr Ala Leu 265 270 275	872
tat gaa ctt gtc atc cgt ggc aac tgc ttc tgc tat ggc cac gcc tca Tyr Glu Leu Val Ile Arg Gly Asn Cys Phe Cys Tyr Gly His Ala Ser 280 285 290	920
cag tgt gcg cct gca cca ggg gcg ccg gcc cat gct gag ggc atg gta Gln Cys Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro Ala His Ala Glu Gly Met Val 295 300 305	968
cac gga gcc tgt atc tgc aag cac aat act cgt gga ctc aac tgt gag His Gly Ala Cys Ile Cys Lys His Asn Thr Arg Gly Leu Asn Cys Glu 310 315 320 325	1016
cag tgt cag gat ttc tat cag gac ctt ccc tgg cac cct gca gag gac Gln Cys Gln Asp Phe Tyr Gln Asp Leu Pro Trp His Pro Ala Glu Asp 330 335 340	1064
ggc cat act cac gcc tgt cgg aag tgt gag tgc aac ggg cat act cat Gly His Thr His Ala Cys Arg Lys Cys Glu Cys Asn Gly His Thr His 345 350 355	1112
agc tgc cac ttt gac atg gct gtc tac ctg gca tct gga aat gta agt Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala Ser Gly Asn Val Ser 360 365 370	1160
gga ggc gta tgc gat ggg tgt cag cac aac aca gct ggg cgc cat tgt Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Gln His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys 375 380 385	1208
gag ttc tgc cgg ccc ttc ttc tac cgt gac ccc acc aag gac atg cgg Glu Phe Cys Arg Pro Phe Phe Tyr Arg Asp Pro Thr Lys Asp Met Arg 390 395 400 405	1256
gac cca gct gtg tgc cgt cct tgt gac tgt gac cct atg ggt tct caa Asp Pro Ala Val Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp Pro Met Gly Ser Gln 410 415 420	1304
gat ggt ggt cgc tgt gat tct cat gat gac cct gtg cta gga ctg gtc Asp Gly Gly Arg Cys Asp Ser His Asp Asp Pro Val Leu Gly Leu Val 425 430 435	1352
tca ggc cag tgt cgc tgc aaa gaa cac gtg gtt ggc act cgc tgc cag Ser Gly Gln Cys Arg Cys Lys Glu His Val Val Gly Thr Arg Cys Gln 440 445 450	1400
caa tgc cgt gat ggc ttc ttt gga ctt agt gcc agt gac cct cga ggg	1448

Gln Cys Arg Asp Gly Phe Phe Gly Leu Ser Ala Ser Asp Pro Arg Gly	
455	460 465
tgc cag cgt tgc cag tgt aat tca cgg ggc aca gtg cct ggg agc tcc	1496
Cys Gln Arg Cys Gln Cys Asn Ser Arg Gly Thr Val Pro Gly Ser Ser	
470	475 480 485
cct tgt gac tcc agt agt gga acc tgt ttc tgc aag cgt ctg gtg acc	1544
Pro Cys Asp Ser Ser Ser Gly Thr Cys Phe Cys Lys Arg Leu Val Thr	
	490 495 500
gga cat ggc tgt gac cgc tgt ctg cct ggc cac tgg ggc ctg agc cat	1592
Gly His Gly Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly His Trp Gly Leu Ser His	
	505 510 515
gac ctg ctg ggc tgc cgt ccc tgt gac tgt gat gtg ggc ggt gcc ttg	1640
Asp Leu Leu Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp Val Gly Gly Ala Leu	
	520 525 530
gat cct cag tgt gat gag gcc acc ggt cag tgc cgc tgc cgc caa cac	1688
Asp Pro Gln Cys Asp Glu Ala Thr Gly Gln Cys Arg Cys Arg Gln His	
	535 540 545
atg att ggg cgg cgc tgc gaa caa gtg cag cct ggc tac ttc cgg cct	1736
Met Ile Gly Arg Arg Cys Glu Gln Val Gln Pro Gly Tyr Phe Arg Pro	
	550 555 560 565
ttt ctg gac cat tta acc tgg gag gct gag gct gcc caa ggg cag ggg	1784
Phe Leu Asp His Leu Thr Trp Glu Ala Glu Ala Ala Gln Gly Gln Gly	
	570 575 580
ctt gag gtg gta gag cgg ctg gtg acc aac cga gag act ccg tcc tgg	1832
Leu Glu Val Val Glu Arg Leu Val Thr Asn Arg Glu Thr Pro Ser Trp	
	585 590 595
act ggc cca ggc ttt gtg cgg ctg cga gaa ggt cag gaa gtg gag ttc	1880
Thr Gly Pro Gly Phe Val Arg Leu Arg Glu Gly Gln Glu Val Glu Phe	
	600 605 610
ctg gtg acc tct ttg cct agg gcc atg gac tat gac ctg cta ctg cgc	1928
Leu Val Thr Ser Leu Pro Arg Ala Met Asp Tyr Asp Leu Leu Leu Arg	
	615 620 625
tgg gag ccc cag gtc cct gag caa tgg gca gag ctg gaa ctg atg gtg	1976
Trp Glu Pro Gln Val Pro Glu Gln Trp Ala Glu Leu Glu Leu Met Val	
	630 635 640 645
cag cgt ccg ggg cct gtg tct gct cac agt ccg tgc ggg cat gtg ctg	2024
Gln Arg Pro Gly Pro Val Ser Ala His Ser Pro Cys Gly His Val Leu	
	650 655 660



cct aag gat gac cgc att cag ggg atg ctt cac cca aac acc agg ttt Pro Lys Asp Asp Arg Ile Gln Gly Met Leu His Pro Asn Thr Arg Phe 665 670 675	2072
ttg gtg ttt ccc aga cct gtc tgc ctt gag cct ggc atc tcc tac aag Leu Val Phe Pro Arg Pro Val Cys Leu Glu Pro Gly Ile Ser Tyr Lys 680 685 690	2120
ctg aag ctg aaa ctg atc gga aca ggg gga cga gcc cag cct gaa acc Leu Lys Leu Lys Leu Ile Gly Thr Gly Gly Arg Ala Gln Pro Glu Thr 695 700 705	2168
tcc tac tct gga tta ctc att gac tcg ctg gtc ctg cag ccc cac gtc Ser Tyr Ser Gly Leu Leu Ile Asp Ser Leu Val Leu Gln Pro His Val 710 715 720 725	2216
ttg gtg cta gag atg ttt agt ggg ggc gat gct gct gct ctg gag cgc Leu Val Leu Glu Met Phe Ser Gly Gly Asp Ala Ala Ala Leu Glu Arg 730 735 740	2264
cgt acc acc ttt gaa cgc tac cgc tgc cat gag gaa ggt ctg atg ccc Arg Thr Thr Phe Glu Arg Tyr Arg Cys His Glu Glu Gly Leu Met Pro 745 750 755	2312
agc aag gcc cct cta tct gag acc tgt gcc ccc ctc ctc atc agc gtg Ser Lys Ala Pro Leu Ser Glu Thr Cys Ala Pro Leu Leu Ile Ser Val 760 765 770	2360
tcc gcc ttg atc tac aat ggc gcc ttg cca tgt cag tgt gac cct caa Ser Ala Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Cys Gln Cys Asp Pro Gln 775 780 785	2408
ggc tca ctg agt tct gaa tgc agt cct cac ggt ggc cag tgc cgg tgc Gly Ser Leu Ser Ser Glu Cys Ser Pro His Gly Gly Gln Cys Arg Cys 790 795 800 805	2456
aaa cct gga gtg gtt gga cgc cgt tgt gat gtc tgt gct act ggc tac Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Val Cys Ala Thr Gly Tyr 810 815 820	2504
tat ggc ttt ggc cct gca ggc tgt caa gcc tgc cag tgt agt cct gat Tyr Gly Phe Gly Pro Ala Gly Cys Gln Ala Cys Gln Cys Ser Pro Asp 825 830 835	2552
gga gca ctc agt gcc ctc tgt gaa ggg act agt gga cag tgc ccc tgc Gly Ala Leu Ser Ala Leu Cys Glu Gly Thr Ser Gly Gln Cys Pro Cys 840 845 850	2600
cga cct ggt gcc ttt ggt ctt cgc tgt gac cac tgt caa cgt ggc cag	2648

Arg Pro Gly Ala Phe Gly Leu Arg Cys Asp His Cys Gln Arg Gly Gln	
855	860 865
tgg gga ttc cct aat tgc cgg ccg tgt gtc tgc aat ggg cgt gcg gat	2696
Trp Gly Phe Pro Asn Cys Arg Pro Cys Val Cys Asn Gly Arg Ala Asp	
870	875 880 885
gag tgt gat acc cac aca ggc gct tgc ctg ggc tgc cgt gat tac acg	2744
Glu Cys Asp Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly Cys Arg Asp Tyr Thr	
	890 895 900
ggg ggc gag cac tgt gaa agg tgc att gct ggt ttt cat ggg gac cca	2792
Gly Gly Glu His Cys Glu Arg Cys Ile Ala Gly Phe His Gly Asp Pro	
	905 910 915
cgg ctg cca tat ggg ggc cag tgc cgg cct tgt ccc tgc cct gaa ggc	2840
Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys Pro Cys Pro Glu Gly	
	920 925 930
cct ggg agc cag cga cac ttt gct act tct tgc cac cgg gat gga tat	2888
Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys His Arg Asp Gly Tyr	
	935 940 945
tcc cag caa att gtg tgc cag tgt cga gaa ggc tac aca ggg ctt cgg	2936
Ser Gln Gln Ile Val Cys Gln Cys Arg Glu Gly Tyr Thr Gly Leu Arg	
950	955 960 965
tgt gaa gct tgt gcc ccc ggg cac ttt ggg gac cca tca aag cca ggt	2984
Cys Glu Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp Pro Ser Lys Pro Gly	
	970 975 980
ggc agg tgc caa ctg tgt gag tgc agt gga aac att gat ccc atg gac	3032
Gly Arg Cys Gln Leu Cys Glu Cys Ser Gly Asn Ile Asp Pro Met Asp	
	985 990 995
cct gat gcc tgt gat ccc cac acg ggg caa tgc ttg cgt tgt tta	3077
Pro Asp Ala Cys Asp Pro His Thr Gly Gln Cys Leu Arg Cys Leu	
	1000 1005 1010
cac aac aca gag ggg ccc cac tgt ggc tat tgc aag cct ggc ttc	3122
His Asn Thr Glu Gly Pro His Cys Gly Tyr Cys Lys Pro Gly Phe	
	1015 1020 1025
cat ggg caa gct gcc cga cag agc tgt cac cgc tgt acc tgc aac	3167
His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg Cys Thr Cys Asn	
	1030 1035 1040
ctt ctg ggc aca gat ccc agg cgg tgc cca tct acc gac ctg tgc	3212
Leu Leu Gly Thr Asp Pro Arg Arg Cys Pro Ser Thr Asp Leu Cys	
	1045 1050 1055

cat tgt gac	cca agc act ggg cag	tgc cca tgc ctt ccc	cat gtc	3257
His Cys Asp	Pro Ser Thr Gly Gln	Cys Pro Cys Leu Pro	His Val	
1060	1065	1070		
caa ggc ctc	aac tgt gac cat tgt	gcc ccc aac ttt tgg	aac ttc	3302
Gln Gly Leu	Asn Cys Asp His Cys	Ala Pro Asn Phe Trp	Asn Phe	
1075	1080	1085		
acc agt ggc	cgt ggc tgc cag cct	tgt gct tgt cac cca	agc cgg	3347
Thr Ser Gly	Arg Gly Cys Gln Pro	Cys Ala Cys His Pro	Ser Arg	
1090	1095	1100		
gcc aga ggc	cct acc tgc aat gag	ttc aca ggg cag tgt	cac tgt	3392
Ala Arg Gly	Pro Thr Cys Asn Glu	Phe Thr Gly Gln Cys	His Cys	
1105	1110	1115		
cat gct ggc	ttt ggt ggg agg act	tgt tct gag tgc caa	gag ctc	3437
His Ala Gly	Phe Gly Gly Arg Thr	Cys Ser Glu Cys Gln	Glu Leu	
1120	1125	1130		
tac tgg gga	gac cct ggt ctg cag	tgc cgt gcc tgt gac	tgt gat	3482
Tyr Trp Gly	Asp Pro Gly Leu Gln	Cys Arg Ala Cys Asp	Cys Asp	
1135	1140	1145		
cct aga gga	ata gac aaa cct cag	tgt cat cgt tcc aca	ggc cac	3527
Pro Arg Gly	Ile Asp Lys Pro Gln	Cys His Arg Ser Thr	Gly His	
1150	1155	1160		
tgt agc tgc	cgc cca ggc gtg tct	ggt gtg cgc tgt gac	cag tgt	3572
Cys Ser Cys	Arg Pro Gly Val Ser	Gly Val Arg Cys Asp	Gln Cys	
1165	1170	1175		
gct cgt ggc	ttc tca ggg gtt ttt	cct gct tgt cac ccc	tgc cac	3617
Ala Arg Gly	Phe Ser Gly Val Phe	Pro Ala Cys His Pro	Cys His	
1180	1185	1190		
gct tgc ttt	gga gac tgg gat cgt	gtg gta cag gac ctg	gct gct	3662
Ala Cys Phe	Gly Asp Trp Asp Arg	Val Val Gln Asp Leu	Ala Ala	
1195	1200	1205		
cgg acg cgg	cgc ctg gag cag tgg	gct cag gag ttg cag	caa aca	3707
Arg Thr Arg	Arg Leu Glu Gln Trp	Ala Gln Glu Leu Gln	Gln Thr	
1210	1215	1220		
gga gtg ctg	ggt gcc ttt gag agc	agc ttt ttg aac atg	cag ggg	3752
Gly Val Leu	Gly Ala Phe Glu Ser	Ser Phe Leu Asn Met	Gln Gly	
1225	1230	1235		
aag cta ggc	atg gtg cag gcc att	atg agt gcc cgc aat	gcc tca	3797

Lys	Leu	Gly	Met	Val	Gln	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Arg	Asn	Ala	Ser		
		1240					1245					1250				
gcc	gcc	tct	acg	gcg	aag	ctt	gta	gag	gcc	aca	gag	gga	cta	cgt		3842
Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	Lys	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Glu	Gly	Leu	Arg		
		1255					1260					1265				
cat	gaa	atc	ggg	aag	acc	acc	gag	cgc	ctg	act	cag	tta	gaa	gca		3887
His	Glu	Ile	Gly	Lys	Thr	Thr	Glu	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Glu	Ala		
		1270					1275					1280				
gag	cta	aca	gct	gtg	cag	gat	gag	aac	ttc	aat	gcc	aac	cat	gca		3932
Glu	Leu	Thr	Ala	Val	Gln	Asp	Glu	Asn	Phe	Asn	Ala	Asn	His	Ala		
		1285					1290					1295				
ctc	agt	ggt	ctg	gag	aga	gac	ggg	ctt	gcg	ctt	aat	ctc	acc	ctg		3977
Leu	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Asp	Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Leu	Thr	Leu		
		1300					1305					1310				
agg	cag	ctg	gat	cag	cat	ctg	gag	atc	ctc	aaa	cat	tca	aat	ttc		4022
Arg	Gln	Leu	Asp	Gln	His	Leu	Glu	Ile	Leu	Lys	His	Ser	Asn	Phe		
		1315					1320					1325				
tta	ggt	gcc	tat	gac	agc	atc	cga	cat	gcc	cac	agc	cag	tcc	aca		4067
Leu	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ser	Ile	Arg	His	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Thr		
		1330					1335					1340				
gag	gca	gag	cgc	cgt	gcc	aac	gcc	tcc	acc	ttt	gca	gta	ccc	agc		4112
Glu	Ala	Glu	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Phe	Ala	Val	Pro	Ser		
		1345					1350					1355				
cct	gtg	agc	aac	tca	gca	gat	acc	cgg	cgt	cgg	acg	gaa	gtg	cta		4157
Pro	Val	Ser	Asn	Ser	Ala	Asp	Thr	Arg	Arg	Arg	Thr	Glu	Val	Leu		
		1360					1365					1370				
atg	ggt	gcc	caa	aaa	gaa	aac	ttc	aac	cgc	caa	cat	ttg	gcc	aac		4202
Met	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Asn	Phe	Asn	Arg	Gln	His	Leu	Ala	Asn		
		1375					1380					1385				
cag	cag	gca	ctg	gga	cgg	ctc	tct	gca	cat	gcc	cac	acc	ctg	agc		4247
Gln	Gln	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Ala	His	Ala	His	Thr	Leu	Ser		
		1390					1395					1400				
ctg	acg	ggc	ata	aat	gag	ttg	gtg	tgt	ggg	gca	cca	ggg	gac	gca		4292
Leu	Thr	Gly	Ile	Asn	Glu	Leu	Val	Cys	Gly	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala		
		1405					1410					1415				
ccc	tgt	gcc	acc	agc	cct	tgt	ggg	ggg	gcc	gga	tgt	cgg	gat	gaa		4337
Pro	Cys	Ala	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Gly	Ala	Gly	Cys	Arg	Asp	Glu		
		1420					1425					1430				

gat ggg cag	ccc cgt tgt ggt ggc	ctc ggt tgc agt ggg	gca gca	4382
Asp Gly Gln	Pro Arg Cys Gly Gly	Leu Gly Cys Ser Gly	Ala Ala	
1435	1440	1445		
gcc acg gca	gat cta gcg ctg ggc	cgg gct cgg cac acg	cag gca	4427
Ala Thr Ala	Asp Leu Ala Leu Gly	Arg Ala Arg His Thr	Gln Ala	
1450	1455	1460		
gag ctg cag	cgg gca ctg gta gaa	ggt ggc ggc atc ctc	agc cgg	4472
Glu Leu Gln	Arg Ala Leu Val Glu	Gly Gly Gly Ile Leu	Ser Arg	
1465	1470	1475		
gtg tct gag	act cgt cgg cag gca	gaa gag gca cag cag	cga gca	4517
Val Ser Glu	Thr Arg Arg Gln Ala	Glu Glu Ala Gln Gln	Arg Ala	
1480	1485	1490		
cag gca gcc	ctg gac aag gct aat	gct tcc agg ggc cag	gtg gaa	4562
Gln Ala Ala	Leu Asp Lys Ala Asn	Ala Ser Arg Gly Gln	Val Glu	
1495	1500	1505		
cag gcc aat	cag gag ctt cga gaa	ctt atc cag aat gtg	aaa gac	4607
Gln Ala Asn	Gln Glu Leu Arg Glu	Leu Ile Gln Asn Val	Lys Asp	
1510	1515	1520		
ttc ctc agc	cag gag gga gcc gat	cct gac agt att gaa	atg gta	4652
Phe Leu Ser	Gln Glu Gly Ala Asp	Pro Asp Ser Ile Glu	Met Val	
1525	1530	1535		
gcg act cgg	gtg cta gac atc tcc	atc ccg gcc tca ccc	gag cag	4697
Ala Thr Arg	Val Leu Asp Ile Ser	Ile Pro Ala Ser Pro	Glu Gln	
1540	1545	1550		
atc cag cgc	cta gcc agt gag att	gca gaa cgc gtc cga	agc ctg	4742
Ile Gln Arg	Leu Ala Ser Glu Ile	Ala Glu Arg Val Arg	Ser Leu	
1555	1560	1565		
gcc gac gtg	gac aca atc ctg gcc	cat acc atg ggc gac	gtg cgt	4787
Ala Asp Val	Asp Thr Ile Leu Ala	His Thr Met Gly Asp	Val Arg	
1570	1575	1580		
cgg gct gaa	cag cta ctg caa gat	gcg cac cgg gca cgg	agc cgg	4832
Arg Ala Glu	Gln Leu Leu Gln Asp	Ala His Arg Ala Arg	Ser Arg	
1585	1590	1595		
gcc gag ggt	gag aga cag aag gca	gag aca gtc caa gcg	gca ctg	4877
Ala Glu Gly	Glu Arg Gln Lys Ala	Glu Thr Val Gln Ala	Ala Leu	
1600	1605	1610		
gag gag gct	cag agg gca caa gga	gct gct cag ggt gcc	atc tgg	4922

Glu Glu Ala	Gln Arg Ala Gln Gly	Ala Ala Gln Gly Ala	Ile Trp	
1615	1620	1625		
gga gca gtg	gtt gac aca caa aac	aca gag cag acc ctg	cag cgg	4967
Gly Ala Val	Val Asp Thr Gln Asn	Thr Glu Gln Thr Leu	Gln Arg	
1630	1635	1640		
gtc cag gag	agg atg gca ggt gca	gag aag tct ctg aac	tct gcc	5012
Val Gln Glu	Arg Met Ala Gly Ala	Glu Lys Ser Leu Asn	Ser Ala	
1645	1650	1655		
ggt gag cgg	gct cgg caa tta gac	gcc ctc ctg gag gcc	ctg aaa	5057
Gly Glu Arg	Ala Arg Gln Leu Asp	Ala Leu Leu Glu Ala	Leu Lys	
1660	1665	1670		
ctg aaa cgg	gca gga aat agc ctg	gca gca tct aca gcg	gaa gaa	5102
Leu Lys Arg	Ala Gly Asn Ser Leu	Ala Ala Ser Thr Ala	Glu Glu	
1675	1680	1685		
aca gca ggc	agt gcc cag agc cgt	gcc agg gag gct gag	aaa caa	5147
Thr Ala Gly	Ser Ala Gln Ser Arg	Ala Arg Glu Ala Glu	Lys Gln	
1690	1695	1700		
cta cgg gaa	caa gta ggt gac caa	tac caa aca gtg agg	gcg ttg	5192
Leu Arg Glu	Gln Val Gly Asp Gln	Tyr Gln Thr Val Arg	Ala Leu	
1705	1710	1715		
gca gag cgg	aag gct gaa ggt gtt	ctg gct gca caa gcc	agg gca	5237
Ala Glu Arg	Lys Ala Glu Gly Val	Leu Ala Ala Gln Ala	Arg Ala	
1720	1725	1730		
gaa caa ctg	cgg gat gag gct cgg	gac ctg ttg cag gcc	gct cag	5282
Glu Gln Leu	Arg Asp Glu Ala Arg	Asp Leu Leu Gln Ala	Ala Gln	
1735	1740	1745		
gat aag ctg	cag cgg cta cag gag	ctg gag ggc aca tat	gag gag	5327
Asp Lys Leu	Gln Arg Leu Gln Glu	Leu Glu Gly Thr Tyr	Glu Glu	
1750	1755	1760		
aac gag cgt	gca ctg gag ggc aaa	gcg gcc cag ctg gat	ggg ctg	5372
Asn Glu Arg	Ala Leu Glu Gly Lys	Ala Ala Gln Leu Asp	Gly Leu	
1765	1770	1775		
gaa gcc agg	atg cgc agt gtg ctc	cag gcc atc aac ttg	cag gtc	5417
Glu Ala Arg	Met Arg Ser Val Leu	Gln Ala Ile Asn Leu	Gln Val	
1780	1785	1790		
cag atc tac	aac acc tgc cag tga	ccactcccta gggcctagcc	ttgtcgccaa	5471
Gln Ile Tyr	Asn Thr Cys Gln			
1795				

gcactgttct gcacacgata gtccgcacat taaagagctc ctggctagca agagctttca 5531

ataaacctgt gtgaacctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 5583

<210> 8

<211> 1799

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Glu Trp Ala Ser Gly Glu Pro Gly Arg Gly Arg Gln Gly Gln Pro  
1 5 10 15

Leu Pro Trp Glu Leu Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala  
20 25 30

Thr Leu Ala Gln Ala Pro Ser Leu Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly  
35 40 45

Ser Cys Tyr Pro Ala Thr Gly Asp Leu Leu Val Gly Arg Ala Asp Arg  
50 55 60

Leu Thr Ala Ser Ser Thr Cys Gly Leu His Ser Pro Gln Pro Tyr Cys  
65 70 75 80

Ile Val Ser His Leu Gln Asp Glu Lys Lys Cys Phe Leu Cys Asp Ser  
85 90 95

Arg Arg Pro Phe Ser Ala Arg Asp Asn Pro Asn Ser His Arg Ile Gln  
100 105 110

Asn Val Val Thr Ser Phe Ala Pro Gln Arg Arg Thr Ala Trp Trp Gln  
115 120 125

Ser Glu Asn Gly Val Pro Met Val Thr Ile Gln Leu Asp Leu Glu Ala  
130 135 140

Glu Phe His Phe Thr His Leu Ile Met Thr Phe Lys Thr Phe Arg Pro

出証特 2 0 0 4 - 3 0 6 7 5 8 1



Asn Gly His Thr His Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala  
355 360 365

Ser Gly Asn Val Ser Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Gln His Asn Thr  
370 375 380

Ala Gly Arg His Cys Glu Phe Cys Arg Pro Phe Phe Tyr Arg Asp Pro  
385 390 395 400

Thr Lys Asp Met Arg Asp Pro Ala Val Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp  
405 410 415

Pro Met Gly Ser Gln Asp Gly Gly Arg Cys Asp Ser His Asp Asp Pro  
420 425 430

Val Leu Gly Leu Val Ser Gly Gln Cys Arg Cys Lys Glu His Val Val  
435 440 445

Gly Thr Arg Cys Gln Gln Cys Arg Asp Gly Phe Phe Gly Leu Ser Ala  
450 455 460

Ser Asp Pro Arg Gly Cys Gln Arg Cys Gln Cys Asn Ser Arg Gly Thr  
465 470 475 480

Val Pro Gly Ser Ser Pro Cys Asp Ser Ser Ser Gly Thr Cys Phe Cys  
485 490 495

Lys Arg Leu Val Thr Gly His Gly Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly His  
500 505 510

Trp Gly Leu Ser His Asp Leu Leu Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp  
515 520 525

Val Gly Gly Ala Leu Asp Pro Gln Cys Asp Glu Ala Thr Gly Gln Cys  
530 535 540

Arg Cys Arg Gln His Met Ile Gly Arg Arg Cys Glu Gln Val Gln Pro

出証特 2 0 0 4 - 3 0 6 7 5 8 1

Glu Gly Leu Met Pro Ser Lys Ala Pro Leu Ser Glu Thr Cys Ala Pro  
755 760 765

Leu Leu Ile Ser Val Ser Ala Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Cys  
770 775 780

Gln Cys Asp Pro Gln Gly Ser Leu Ser Ser Glu Cys Ser Pro His Gly  
785 790 795 800

Gly Gln Cys Arg Cys Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Val  
805 810 815

Cys Ala Thr Gly Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Ala Gly Cys Gln Ala Cys  
820 825 830

Gln Cys Ser Pro Asp Gly Ala Leu Ser Ala Leu Cys Glu Gly Thr Ser  
835 840 845

Gly Gln Cys Pro Cys Arg Pro Gly Ala Phe Gly Leu Arg Cys Asp His  
850 855 860

Cys Gln Arg Gly Gln Trp Gly Phe Pro Asn Cys Arg Pro Cys Val Cys  
865 870 875 880

Asn Gly Arg Ala Asp Glu Cys Asp Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly  
885 890 895

Cys Arg Asp Tyr Thr Gly Gly Glu His Cys Glu Arg Cys Ile Ala Gly  
900 905 910

Phe His Gly Asp Pro Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys  
915 920 925

Pro Cys Pro Glu Gly Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys  
930 935 940

His Arg Asp Gly Tyr Ser Gln Gln Ile Val Cys Gln Cys Arg Glu Gly

945

950

955

960

Tyr Thr Gly Leu Arg Cys Glu Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp  
                   965                  970                  975

Pro Ser Lys Pro Gly Gly Arg Cys Gln Leu Cys Glu Cys Ser Gly Asn  
                   980                  985                  990

Ile Asp Pro Met Asp Pro Asp Ala Cys Asp Pro His Thr Gly Gln Cys  
                   995                  1000                  1005

Leu Arg Cys Leu His Asn Thr Glu Gly Pro His Cys Gly Tyr Cys  
           1010                  1015                  1020

Lys Pro Gly Phe His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg  
           1025                  1030                  1035

Cys Thr Cys Asn Leu Leu Gly Thr Asp Pro Arg Arg Cys Pro Ser  
           1040                  1045                  1050

Thr Asp Leu Cys His Cys Asp Pro Ser Thr Gly Gln Cys Pro Cys  
           1055                  1060                  1065

Leu Pro His Val Gln Gly Leu Asn Cys Asp His Cys Ala Pro Asn  
           1070                  1075                  1080

Phe Trp Asn Phe Thr Ser Gly Arg Gly Cys Gln Pro Cys Ala Cys  
           1085                  1090                  1095

His Pro Ser Arg Ala Arg Gly Pro Thr Cys Asn Glu Phe Thr Gly  
           1100                  1105                  1110

Gln Cys His Cys His Ala Gly Phe Gly Gly Arg Thr Cys Ser Glu  
           1115                  1120                  1125

Cys Gln Glu Leu Tyr Trp Gly Asp Pro Gly Leu Gln Cys Arg Ala  
           1130                  1135                  1140

Cys Asp Cys Asp Pro Arg Gly Ile Asp Lys Pro Gln Cys His Arg  
1145 1150 1155

Ser Thr Gly His Cys Ser Cys Arg Pro Gly Val Ser Gly Val Arg  
1160 1165 1170

Cys Asp Gln Cys Ala Arg Gly Phe Ser Gly Val Phe Pro Ala Cys  
1175 1180 1185

His Pro Cys His Ala Cys Phe Gly Asp Trp Asp Arg Val Val Gln  
1190 1195 1200

Asp Leu Ala Ala Arg Thr Arg Arg Leu Glu Gln Trp Ala Gln Glu  
1205 1210 1215

Leu Gln Gln Thr Gly Val Leu Gly Ala Phe Glu Ser Ser Phe Leu  
1220 1225 1230

Asn Met Gln Gly Lys Leu Gly Met Val Gln Ala Ile Met Ser Ala  
1235 1240 1245

Arg Asn Ala Ser Ala Ala Ser Thr Ala Lys Leu Val Glu Ala Thr  
1250 1255 1260

Glu Gly Leu Arg His Glu Ile Gly Lys Thr Thr Glu Arg Leu Thr  
1265 1270 1275

Gln Leu Glu Ala Glu Leu Thr Ala Val Gln Asp Glu Asn Phe Asn  
1280 1285 1290

Ala Asn His Ala Leu Ser Gly Leu Glu Arg Asp Gly Leu Ala Leu  
1295 1300 1305

Asn Leu Thr Leu Arg Gln Leu Asp Gln His Leu Glu Ile Leu Lys  
1310 1315 1320

His Ser Asn Phe Leu Gly Ala Tyr Asp Ser Ile Arg His Ala His

1325	1330	1335
Ser Gln Ser Thr Glu Ala Glu Arg Arg Ala Asn Ala Ser Thr Phe		
1340	1345	1350
Ala Val Pro Ser Pro Val Ser Asn Ser Ala Asp Thr Arg Arg Arg		
1355	1360	1365
Thr Glu Val Leu Met Gly Ala Gln Lys Glu Asn Phe Asn Arg Gln		
1370	1375	1380
His Leu Ala Asn Gln Gln Ala Leu Gly Arg Leu Ser Ala His Ala		
1385	1390	1395
His Thr Leu Ser Leu Thr Gly Ile Asn Glu Leu Val Cys Gly Ala		
1400	1405	1410
Pro Gly Asp Ala Pro Cys Ala Thr Ser Pro Cys Gly Gly Ala Gly		
1415	1420	1425
Cys Arg Asp Glu Asp Gly Gln Pro Arg Cys Gly Gly Leu Gly Cys		
1430	1435	1440
Ser Gly Ala Ala Ala Thr Ala Asp Leu Ala Leu Gly Arg Ala Arg		
1445	1450	1455
His Thr Gln Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Val Glu Gly Gly Gly		
1460	1465	1470
Ile Leu Ser Arg Val Ser Glu Thr Arg Arg Gln Ala Glu Glu Ala		
1475	1480	1485
Gln Gln Arg Ala Gln Ala Ala Leu Asp Lys Ala Asn Ala Ser Arg		
1490	1495	1500
Gly Gln Val Glu Gln Ala Asn Gln Glu Leu Arg Glu Leu Ile Gln		
1505	1510	1515

Asn Val Lys Asp Phe Leu Ser Gln Glu Gly Ala Asp Pro Asp Ser

1520

1525

1530

Ile Glu Met Val Ala Thr Arg Val Leu Asp Ile Ser Ile Pro Ala

1535

1540

1545

Ser Pro Glu Gln Ile Gln Arg Leu Ala Ser Glu Ile Ala Glu Arg

1550

1555

1560

Val Arg Ser Leu Ala Asp Val Asp Thr Ile Leu Ala His Thr Met

1565

1570

1575

Gly Asp Val Arg Arg Ala Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala His Arg

1580

1585

1590

Ala Arg Ser Arg Ala Glu Gly Glu Arg Gln Lys Ala Glu Thr Val

1595

1600

1605

Gln Ala Ala Leu Glu Glu Ala Gln Arg Ala Gln Gly Ala Ala Gln

1610

1615

1620

Gly Ala Ile Trp Gly Ala Val Val Asp Thr Gln Asn Thr Glu Gln

1625

1630

1635

Thr Leu Gln Arg Val Gln Glu Arg Met Ala Gly Ala Glu Lys Ser

1640

1645

1650

Leu Asn Ser Ala Gly Glu Arg Ala Arg Gln Leu Asp Ala Leu Leu

1655

1660

1665

Glu Ala Leu Lys Leu Lys Arg Ala Gly Asn Ser Leu Ala Ala Ser

1670

1675

1680

Thr Ala Glu Glu Thr Ala Gly Ser Ala Gln Ser Arg Ala Arg Glu

1685

1690

1695

Ala Glu Lys Gln Leu Arg Glu Gln Val Gly Asp Gln Tyr Gln Thr  
 1700 1705 1710

Val Arg Ala Leu Ala Glu Arg Lys Ala Glu Gly Val Leu Ala Ala  
 1715 1720 1725

Gln Ala Arg Ala Glu Gln Leu Arg Asp Glu Ala Arg Asp Leu Leu  
 1730 1735 1740

Gln Ala Ala Gln Asp Lys Leu Gln Arg Leu Gln Glu Leu Glu Gly  
 1745 1750 1755

Thr Tyr Glu Glu Asn Glu Arg Ala Leu Glu Gly Lys Ala Ala Gln  
 1760 1765 1770

Leu Asp Gly Leu Glu Ala Arg Met Arg Ser Val Leu Gln Ala Ile  
 1775 1780 1785

Asn Leu Gln Val Gln Ile Tyr Asn Thr Cys Gln  
 1790 1795

<210> 9

<211> 5153

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1476)

<223> laminin 12 gamma 3 chain

<400> 9

atg gct gta tcc agg gtc ctg tcc ctc ctg gca acg gtg gca tcg atg 48  
 Met Ala Val Ser Arg Val Leu Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Ser Met  
 1 5 10 15

gcg ctg gtg att cag gag aca cac ttc gcg gca ggc gcg gac atg ggc 96  
 Ala Leu Val Ile Gln Glu Thr His Phe Ala Ala Gly Ala Asp Met Gly  
 20 25 30

tct tgc tac gac ggt gtg gga cgc gca cag cgc tgt ctg cct gag ttc 144  
 Ser Cys Tyr Asp Gly Val Gly Arg Ala Gln Arg Cys Leu Pro Glu Phe



35	40	45	
gag aac gcg gcg ttc ggc cga cgc gcc gag gcc tcc cac acg tgc gga			192
Glu Asn Ala Ala Phe Gly Arg Arg Ala Glu Ala Ser His Thr Cys Gly			
50	55	60	
cgg ccc ccg gag gac ttc tgt cca cac gtg ggg gca cca ggg gct ggg			240
Arg Pro Pro Glu Asp Phe Cys Pro His Val Gly Ala Pro Gly Ala Gly			
65	70	75	80
cta cag tgc cag cgc tgc gac gat gct gac ccc gga cga cgc cac gac			288
Leu Gln Cys Gln Arg Cys Asp Asp Ala Asp Pro Gly Arg Arg His Asp			
	85	90	95
gcc tcc tac ctc aca gac ttc cac agc ccc gat gac agc acc tgg tgg			336
Ala Ser Tyr Leu Thr Asp Phe His Ser Pro Asp Asp Ser Thr Trp Trp			
	100	105	110
cag agc cca tcc atg gcc ttc ggg gtg cag tac ccc acc tcg gtt aac			384
Gln Ser Pro Ser Met Ala Phe Gly Val Gln Tyr Pro Thr Ser Val Asn			
	115	120	125
ctg acc ttg agc tta ggg aag gcc tat gag att acc tat gtg agg ctg			432
Leu Thr Leu Ser Leu Gly Lys Ala Tyr Glu Ile Thr Tyr Val Arg Leu			
	130	135	140
aag ttc cac acc agt cgc cct gag agt ttt gcc atc tac aag cgc acg			480
Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Glu Ser Phe Ala Ile Tyr Lys Arg Thr			
145	150	155	160
tac gcc agt ggc ccc tgg gag ccc tac caa tac tac agt gcc tcc tgc			528
Tyr Ala Ser Gly Pro Trp Glu Pro Tyr Gln Tyr Tyr Ser Ala Ser Cys			
	165	170	175
cag aaa acc tat ggc cgt cct gag ggc cac tac ctg cga ccg ggc gag			576
Gln Lys Thr Tyr Gly Arg Pro Glu Gly His Tyr Leu Arg Pro Gly Glu			
	180	185	190
gat gag agg gtg gcc ttc tgc acc tct gag ttc agt gac atc tcc ccc			624
Asp Glu Arg Val Ala Phe Cys Thr Ser Glu Phe Ser Asp Ile Ser Pro			
	195	200	205
ttg aac ggg ggc aac gtg gcc ttc tcc acc ctg gaa ggc cgt ccc agt			672
Leu Asn Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr Leu Glu Gly Arg Pro Ser			
	210	215	220
gcc tac aac ttt gag gag agc cct gtg ctg cag gag tgg gtc acc agc			720
Ala Tyr Asn Phe Glu Glu Ser Pro Val Leu Gln Glu Trp Val Thr Ser			
225	230	235	240

act gac atc ctg atc tct cta gat cgg ctc aac acg ttt ggg gat gac Thr Asp Ile Leu Ile Ser Leu Asp Arg Leu Asn Thr Phe Gly Asp Asp 245 250 255	768
atc ttc aag gac ccc aga gtg ctc cag tct tac tac tac gct gtg tct Ile Phe Lys Asp Pro Arg Val Leu Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ala Val Ser 260 265 270	816
gac ttc tct gtg ggt ggc agg tgc aaa tgc aat ggt cac gcc agt gaa Asp Phe Ser Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn Gly His Ala Ser Glu 275 280 285	864
tgc gaa ccc aat gcg gct ggt cag ctg gct tgc cgc tgt cag cac aac Cys Glu Pro Asn Ala Ala Gly Gln Leu Ala Cys Arg Cys Gln His Asn 290 295 300	912
acc aca gga gtg gac tgc gag cgt tgt ctg ccc ttc ttc cag gac cgt Thr Thr Gly Val Asp Cys Glu Arg Cys Leu Pro Phe Phe Gln Asp Arg 305 310 315 320	960
ccg tgg gcc cga ggc acc gcc gag gat gcc aac gag tgt ctg ccc tgc Pro Trp Ala Arg Gly Thr Ala Glu Asp Ala Asn Glu Cys Leu Pro Cys 325 330 335	1008
aac tgc agt ggg cac tct gag gag tgc acg ttt gac agg gag ctc tat Asn Cys Ser Gly His Ser Glu Glu Cys Thr Phe Asp Arg Glu Leu Tyr 340 345 350	1056
cgg agc aca ggc cat ggt ggg cac tgt cag cgg tgc cgt gac cac aca Arg Ser Thr Gly His Gly Gly His Cys Gln Arg Cys Arg Asp His Thr 355 360 365	1104
act ggg cca cac tgt gag cgc tgt gag aag aac tac tac aga tgg tcc Thr Gly Pro His Cys Glu Arg Cys Glu Lys Asn Tyr Tyr Arg Trp Ser 370 375 380	1152
ccg aag aca cca tgc caa ccc tgt gac tgc cac cca gca ggc tct ctg Pro Lys Thr Pro Cys Gln Pro Cys Asp Cys His Pro Ala Gly Ser Leu 385 390 395 400	1200
agt ctc cag tgt gac aac tca ggc gtc tgt ccc tgc aag ccc aca gtg Ser Leu Gln Cys Asp Asn Ser Gly Val Cys Pro Cys Lys Pro Thr Val 405 410 415	1248
act ggc tgg aag tgt gac cgc tgc ctg cct gga ttc cac tca ctc agt Thr Gly Trp Lys Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly Phe His Ser Leu Ser 420 425 430	1296
gag ggc ggc tgc aga ccc tgt gcc tgc aat gtc gcc ggc agc ttg ggc Glu Gly Gly Cys Arg Pro Cys Ala Cys Asn Val Ala Gly Ser Leu Gly	1344

435	440	445	
acc tgt gac ccc cgc agt ggg aac tgt ccc tgc aaa gag aat gta gaa Thr Cys Asp Pro Arg Ser Gly Asn Cys Pro Cys Lys Glu Asn Val Glu 450 455 460			1392
ggc agc ctg tgt gac aga tgc cgc cct ggg aca ttt aac ctg cag ccc Gly Ser Leu Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Thr Phe Asn Leu Gln Pro 465 470 475 480			1440
cac aat cca gtg ggc tgc agc agc tgc ttc tgt tat ggccactcca His Asn Pro Val Gly Cys Ser Ser Cys Phe Cys Tyr 485 490			1486
aggtgtgttc tcctgtgcc gggttccagg aacaccacat ccgctcagac ttccgccatg			1546
gagctggtgg ctggcagatc agaagcatgg gagtgtccaa gcgtcctctg caatggagcc			1606
agagtgggct cctcctgggc ctgcgaggag gggaggaact ctcagcccca aagaagttcc			1666
tgggagacca gagactcagc tatggacagc cagtcatact gaccctccaa gtacccccctg			1726
gaggctcccc acctcctatt cagctgagac tggagggagc aggcttggct ctgtctctga			1786
ggccctccag tctaccacgc cctcaggaca ccaggcagcc aagacgagtt cagctccagt			1846
tcctcttgca ggagacttct gaggaggcag agtccccact gccacattc cacttccagc			1906
gcctgctttc caatctgact gctctgagca tctggaccag tggccaagga ccgggccatt			1966
ctggccaagt gctcttgtgt gaagttcagc tcacatcggc ctggccccag cgtgagcttg			2026
cccctccagc ctcttgggtg gagacctgct tatgtcccca gggatacaca ggccagttct			2086
gtgaattctg tgctctggga tacaagagag aaatacctca tgggggtccc tatgccaaact			2146
gcattccctg cacctgcaac cagcatggca cctgtgaccc caacacaggg atctgcctgt			2206
gtggccacca caccgagggt ccacctgtg agcgggtgcat gccaggtttc tacggtaacg			2266
ccttctcagg ccgtgctgat gattgccagc cctgtccgtg ccctggccaa tcagcctgtg			2326
caaccatccc agagagtgga gatgtggtgt gcacacactg ccctcctggg cagagaggac			2386
gacgatgcga gagctgcgaa gatggctttt ttggggatcc tctagggctc tctggagctc			2446
cccagccctg ccgccgatgc cagtgcagcg ggaacgtgga tctcaatgct gtgggcaact			2506
gtgacacctca ttctggccac tgcttgcgct gtctgtacaa cacgacaggg gccactgcg			2566

agcactgtcg ggagggtttc tacgggagtg cctgggccac aaggcccgtg gacaaatgtg 2626  
ctccctgcag ctgtgacctg aggggctcag tcagtgagaa gacctgcaac cctgtgactg 2686  
gccagtgtgt ctgcctgcct tatgtctccg ggagggactg cagccgctgc agccctggct 2746  
tctatgacct ccagtctggg aggggctgcc agagctgcaa atgtcaccca cttggatcct 2806  
tggagaataa gtgccacccc aagactggcc agtgtccctg ccgacctggt gtcactggcc 2866  
aagcctgtga cagatgccag ctaggtttct ttggcttctc catcaagggc tgccgagact 2926  
gtaggtgctc cccattgggt gctgcctcat ctgagtcca tgagaacagc acctgtgtgt 2986  
gccggcccgg ctttgtgggc tataaatgcg accgctgcca ggacaatttc ttcctgcgg 3046  
atggcgacac aggctgcca gagtgtcca cttgctatgc cctagtgaag gaagaggcag 3106  
ccaagctgaa ggccagggtg atgctgatgg aggggtggct tcaaaggctc gactgtggta 3166  
gcccctgggg accactagac attctgcagg gagaagcccc tctgggggat gtctaccaag 3226  
gtcaccacct acttcaagag acccggggga cttcctgca gcagatggtg ggccctggagg 3286  
attctgtgaa ggccacttgg gagcagttgc aggtgctgag agggcatgta cactgtgccc 3346  
aggctggagc tcagaagacc tgcattccagc tggcagagct ggaggagaca ttgcagtcct 3406  
cagaggagga ggtccttcgt gcagcctcag ctctctcatt tctggcaagt cttcagaaag 3466  
gatccagcac accaccaat tggagtcacc tggcatcaga ggcccagatc cttgccagaa 3526  
gccacaggga cacggccacc aagatcgaag ctacctcgga aagggccctg ctgcctcca 3586  
acgccagcta tgagtcctg aagctgatgg aaggcagagt ggccctcgga gccagcagg 3646  
aactggagga caggtaccag gaggtgcagg cagctcagac tgccctgggc atagctgtgg 3706  
cagaggcgct gccc aaagct gaaaaggcac tggccacggt gaagcaagtc attggtgacg 3766  
cagccccaca tctaggcttg ctggtcacc ctgaagcaat gaacttcaa gccaggggcc 3826  
tgagctggaa agtgaaggcc ctggagcaga agctggagca gaaggagccc gaggtgggcc 3886  
agtctgtggg agccctgcag gtggaggctg gaagagcctt ggagaagatg gagcccttta 3946  
tgcagctacg caataagacc acagctgcct tcacacgggc ttcctcagct gtgcaagctg 4006  
ccaaggtgac cgtcatagga gcagagaccc tgctagctga cctagaggga atgaagctga 4066

ggtctcctct acccaaggag caggcagcgc tgaagaagaa agcaggcagc atcaggacca 4126  
 ggctcctgga ggacacaaag aggaagacca agcatgcaga gaggatgctg ggaaatgctg 4186  
 cctctctctc ctccagcacc aagaagaaaa gcaaagaagc agaactgatg tctaaggaca 4246  
 atgccaagct ctccagagct ttgctgaggg aaggcaagca gggctaccgt catgccagcc 4306  
 gactcgccag ccagaccag gccacactcc gtcgggcctc tcgcctgctg ctgacctcag 4366  
 aagcacacaa gcaggagctg gaggaagcta aacaggtgac ctctgggctg agcactgtgg 4426  
 agcgccaggt ccgagagtct cggatctcct tggagaagga caccaaggctc ctgtcagagc 4486  
 tgcttgtgaa gctgggggtcc ctgggtgtcc accaagcccc tgctcagacc ctgaacgaga 4546  
 cccagcgggc actagaaagc ttgaggctgc agctggattc ccacggagcc ctgcatcaca 4606  
 aactgaggca gctggaggaa gagtctgctc gacaggagct gcagattcag agctttgagg 4666  
 acgaccttgc tgagatccgc gctgacaagc acaacttga gaccattctg agcagtctgc 4726  
 cagagaactg tgccagctag accctgggtac accctcccca ccctgccgtt tcctgtccac 4786  
 tcctgttagg tgtcccaggt ctgcctgtcg tatgttcacg tgaatgcttg tttgctgggtg 4846  
 catcttcggt ctgagcagga gtgaatacat gtcacacct ccacagatga ccctgtatgt 4906  
 agtcctcagt gtgtactctc taaacgtgca tcagcataca caccagta tttgcacata 4966  
 tgtgtatgtg atgcactgat gtgtaagac cacctgtgtg catgcacaca tatgagagtc 5026  
 tagagctgtg gagagcagtc ctgagcttgg cacatccaca ttctgggtggg ttcctgctat 5086  
 gaatatcctg caggatgaca catctacacc tcctcagaat cagggccaac aggtgtactc 5146  
 gagctga 5153

<210> 10  
 <211> 492  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 10

Met Ala Val Ser Arg Val Leu Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Ser Met  
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ile Gln Glu Thr His Phe Ala Ala Gly Ala Asp Met Gly  
20 25 30

Ser Cys Tyr Asp Gly Val Gly Arg Ala Gln Arg Cys Leu Pro Glu Phe  
35 40 45

Glu Asn Ala Ala Phe Gly Arg Arg Ala Glu Ala Ser His Thr Cys Gly  
50 55 60

Arg Pro Pro Glu Asp Phe Cys Pro His Val Gly Ala Pro Gly Ala Gly  
65 70 75 80

Leu Gln Cys Gln Arg Cys Asp Asp Ala Asp Pro Gly Arg Arg His Asp  
85 90 95

Ala Ser Tyr Leu Thr Asp Phe His Ser Pro Asp Asp Ser Thr Trp Trp  
100 105 110

Gln Ser Pro Ser Met Ala Phe Gly Val Gln Tyr Pro Thr Ser Val Asn  
115 120 125

Leu Thr Leu Ser Leu Gly Lys Ala Tyr Glu Ile Thr Tyr Val Arg Leu  
130 135 140

Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Glu Ser Phe Ala Ile Tyr Lys Arg Thr  
145 150 155 160

Tyr Ala Ser Gly Pro Trp Glu Pro Tyr Gln Tyr Tyr Ser Ala Ser Cys  
165 170 175

Gln Lys Thr Tyr Gly Arg Pro Glu Gly His Tyr Leu Arg Pro Gly Glu  
180 185 190

Asp Glu Arg Val Ala Phe Cys Thr Ser Glu Phe Ser Asp Ile Ser Pro  
195 200 205

Leu Asn Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr Leu Glu Gly Arg Pro Ser

210

215

220

Ala Tyr Asn Phe Glu Glu Ser Pro Val Leu Gln Glu Trp Val Thr Ser  
 225 230 235 240

Thr Asp Ile Leu Ile Ser Leu Asp Arg Leu Asn Thr Phe Gly Asp Asp  
 245 250 255

Ile Phe Lys Asp Pro Arg Val Leu Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ala Val Ser  
 260 265 270

Asp Phe Ser Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn Gly His Ala Ser Glu  
 275 280 285

Cys Glu Pro Asn Ala Ala Gly Gln Leu Ala Cys Arg Cys Gln His Asn  
 290 295 300

Thr Thr Gly Val Asp Cys Glu Arg Cys Leu Pro Phe Phe Gln Asp Arg  
 305 310 315 320

Pro Trp Ala Arg Gly Thr Ala Glu Asp Ala Asn Glu Cys Leu Pro Cys  
 325 330 335

Asn Cys Ser Gly His Ser Glu Glu Cys Thr Phe Asp Arg Glu Leu Tyr  
 340 345 350

Arg Ser Thr Gly His Gly Gly His Cys Gln Arg Cys Arg Asp His Thr  
 355 360 365

Thr Gly Pro His Cys Glu Arg Cys Glu Lys Asn Tyr Tyr Arg Trp Ser  
 370 375 380

Pro Lys Thr Pro Cys Gln Pro Cys Asp Cys His Pro Ala Gly Ser Leu  
 385 390 395 400

Ser Leu Gln Cys Asp Asn Ser Gly Val Cys Pro Cys Lys Pro Thr Val  
 405 410 415

Thr Gly Trp Lys Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly Phe His Ser Leu Ser  
 420 425 430

Glu Gly Gly Cys Arg Pro Cys Ala Cys Asn Val Ala Gly Ser Leu Gly  
 435 440 445

Thr Cys Asp Pro Arg Ser Gly Asn Cys Pro Cys Lys Glu Asn Val Glu  
 450 455 460

Gly Ser Leu Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Thr Phe Asn Leu Gln Pro  
 465 470 475 480

His Asn Pro Val Gly Cys Ser Ser Cys Phe Cys Tyr  
 485 490

<210> 11  
 <211> 2265  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<400> 11

Gln Ala Gln Gln Ile Val Gln Pro Gln Ser Pro Leu Thr Val Ser Gln  
 1 5 10 15

Ser Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr Gln Ile Asn Gln  
 20 25 30

Gln Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Ser Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr  
 35 40 45

Gly Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Pro Glu Glu  
 50 55 60

Thr Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr  
 65 70 75 80

Tyr Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly  
 85 90 95



Ala Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu

100

105

110

Gly Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu

115

120

125

Thr Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly

130

135

140

Glu Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp Gln Ala Ala

145

150

155

160

Gly Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly

165

170

175

Trp Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile

180

185

190

Thr Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser

195

200

205

Tyr Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu

210

215

220

Leu Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu

225

230

235

240

Arg His Thr Ser Leu Gln Thr Thr Ser Ala Gly Ser Gly Ser Phe Thr

245

250

255

Asp Val Arg Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro

260

265

270

Pro Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly

275

280

285

Met Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys  
290 295 300

Leu Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr  
305 310 315 320

Gly Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn  
325 330 335

Gly Lys Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp Gly His  
340 345 350

Leu Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser  
355 360 365

Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser  
370 375 380

Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr  
385 390 395 400

Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly  
405 410 415

Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met  
420 425 430

Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg  
435 440 445

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg  
450 455 460

Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Val Ala Tyr  
465 470 475 480

Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Gly Ile Thr Tyr Asn Val

485

490

495

Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys  
 500 505 510

Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp  
 515 520 525

Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Arg Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser  
 530 535 540

Trp Glu Lys Tyr Leu Gln Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly  
 545 550 555 560

Arg Gly Ile Gly Glu Trp Ala Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Asp  
 565 570 575

Thr Ser Gly Pro Val Gln Val Ile Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro  
 580 585 590

Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Ser Ala Pro Glu Ser Ser His Ile Ser  
 595 600 605

Lys Tyr Ile Leu Arg Trp Lys Pro Lys Asn Ser Pro Asp Arg Trp Lys  
 610 615 620

Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu  
 625 630 635 640

Arg Pro Gly Val Val Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Val Gln His Tyr  
 645 650 655

Gly Gln Arg Glu Val Thr Arg Phe Asp Phe Thr Thr Thr Ser Thr Ser  
 660 665 670

Pro Ala Val Thr Ser Asn Thr Val Thr Gly Glu Thr Thr Pro Leu Ser  
 675 680 685

Pro Val Val Ala Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser  
690 695 700

Phe Val Val Ser Trp Val Ser Ala Ser Asp Thr Val Ser Gly Phe Arg  
705 710 715 720

Val Glu Tyr Glu Leu Ser Glu Glu Gly Asp Glu Pro Gln Tyr Leu Asp  
725 730 735

Leu Pro Ser Thr Ala Thr Ser Val Asn Ile Pro Asp Leu Leu Pro Gly  
740 745 750

Arg Lys Tyr Thr Val Asn Val Tyr Glu Ile Ser Glu Glu Gly Glu Gln  
755 760 765

Asn Leu Ile Leu Ser Thr Ser Gln Thr Thr Ala Pro Asp Ala Pro Pro  
770 775 780

Asp Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg Trp  
785 790 795 800

Ser Arg Pro Arg Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Val Tyr Ser Pro  
805 810 815

Ser Val Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Asn Leu Pro Glu Thr Ala Asn  
820 825 830

Ser Val Thr Leu Ser Asp Leu Gln Pro Gly Val Gln Tyr Asn Ile Thr  
835 840 845

Ile Tyr Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Thr Pro Val Phe Ile Gln  
850 855 860

Gln Glu Thr Thr Gly Val Pro Arg Ser Asp Lys Val Pro Pro Pro Arg  
865 870 875 880

Asp Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys Ile Thr Ile Met Trp  
                     885                    890                    895

Thr Pro Pro Glu Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Asp Val Ile Pro  
                     900                    905                    910

Val Asn Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg Leu Pro Val Ser Arg Asn  
                     915                    920                    925

Thr Phe Ala Glu Val Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr His Phe  
                     930                    935                    940

Lys Val Phe Ala Val Asn Gln Gly Arg Glu Ser Lys Pro Leu Thr Ala  
                     945                    950                    955                    960

Gln Gln Ala Thr Lys Leu Asp Ala Pro Thr Asn Leu Gln Phe Ile Asn  
                     965                    970                    975

Glu Thr Asp Thr Thr Val Ile Val Thr Trp Thr Pro Pro Arg Ala Arg  
                     980                    985                    990

Ile Val Gly Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg Gly Gly Gln Pro  
                     995                    1000                    1005

Lys Gln Tyr Asn Val Gly Pro Ala Ala Ser Gln Tyr Pro Leu Arg  
                     1010                    1015                    1020

Asn Leu Gln Pro Gly Ser Glu Tyr Ala Val Ser Leu Val Ala Val  
                     1025                    1030                    1035

Lys Gly Asn Gln Gln Ser Pro Arg Val Thr Gly Val Phe Thr Thr  
                     1040                    1045                    1050

Leu Gln Pro Leu Gly Ser Ile Pro His Tyr Asn Thr Glu Val Thr  
                     1055                    1060                    1065

Glu Thr Thr Ile Val Ile Thr Trp Thr Pro Ala Pro Arg Ile Gly  
                     1070                    1075                    1080

Phe Lys Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg  
1085 1090 1095

Glu Val Thr Ser Glu Ser Gly Ser Ile Val Val Ser Gly Leu Thr  
1100 1105 1110

Pro Gly Val Glu Tyr Val Tyr Thr Ile Ser Val Leu Arg Asp Gly  
1115 1120 1125

Gln Glu Arg Asp Ala Pro Ile Val Lys Lys Val Val Thr Pro Leu  
1130 1135 1140

Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr Gly  
1145 1150 1155

Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr  
1160 1165 1170

Gly Tyr Arg Ile Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly Tyr  
1175 1180 1185

Ser Leu Glu Glu Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr Phe  
1190 1195 1200

Glu Asn Leu Ser Pro Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr Thr  
1205 1210 1215

Val Lys Asp Asp Lys Glu Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile Ile  
1220 1225 1230

Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Val Gly  
1235 1240 1245

Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ser Ile Glu  
1250 1255 1260

Leu Thr Asn Leu Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu  
1265 1270 1275

Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val  
1280 1285 1290

Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Leu Val Ser Val Ser  
1295 1300 1305

Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Ile Pro Leu Arg Gly Arg Gln  
1310 1315 1320

Lys Thr Ala Leu Asp Ser Pro Ser Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile  
1325 1330 1335

Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr  
1340 1345 1350

Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu Asn Met Gly Gly  
1355 1360 1365

Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro Pro Ser Arg Asn Ser Ile Thr  
1370 1375 1380

Leu Thr Asn Leu Asn Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val  
1385 1390 1395

Ala Leu Asn Ser Lys Glu Glu Ser Leu Pro Leu Val Gly Gln Gln  
1400 1405 1410

Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Ile Ala Ala  
1415 1420 1425

Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr  
1430 1435 1440

Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Ser Ser  
1445 1450 1455

Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr  
1460 1465 1470

Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr  
1475 1480 1485

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Val  
1490 1495 1500

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln  
1505 1510 1515

Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Arg Trp Leu Pro  
1520 1525 1530

Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Ala Pro Lys  
1535 1540 1545

Asn Gly Pro Gly Pro Ser Lys Thr Lys Thr Val Gly Pro Asp Gln  
1550 1555 1560

Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val  
1565 1570 1575

Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Gln Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu  
1580 1585 1590

Val Gln Thr Ala Val Thr Thr Ile Pro Ala Pro Thr Asn Leu Lys  
1595 1600 1605

Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Thr Ala Gln Trp Thr Ala  
1610 1615 1620

Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys  
1625 1630 1635



Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser  
1640 1645 1650

Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu  
1655 1660 1665

Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala  
1670 1675 1680

Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg  
1685 1690 1695

Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp  
1700 1705 1710

Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile  
1715 1720 1725

Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Arg Pro Asp  
1730 1735 1740

Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr  
1745 1750 1755

Lys Ile His Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro  
1760 1765 1770

Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu  
1775 1780 1785

Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln  
1790 1795 1800

Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys  
1805 1810 1815

Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly  
1820 1825 1830

Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr  
1835 1840 1845

Thr Ile Gln Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro  
1850 1855 1860

Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr  
1865 1870 1875

Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro  
1880 1885 1890

Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Ile Thr Asn Pro Gly Tyr Asp  
1895 1900 1905

Thr Gly Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro  
1910 1915 1920

Ser Leu Gly Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His Gly Phe Arg Arg  
1925 1930 1935

Thr Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Pro Val Arg His Arg Pro Arg  
1940 1945 1950

Pro Tyr Pro Pro Asn Val Asn Glu Glu Ile Gln Ile Gly His Val  
1955 1960 1965

Pro Arg Gly Asp Val Asp His His Leu Tyr Pro His Val Val Gly  
1970 1975 1980

Leu Asn Pro Asn Ala Ser Thr Gly Gln Glu Ala Leu Ser Gln Thr  
1985 1990 1995

Thr Ile Ser Trp Thr Pro Phe Gln Glu Ser Ser Glu Tyr Ile Ile  
2000 2005 2010

Ser Cys His Pro Val Gly Ile Asp Glu Glu Pro Leu Gln Phe Arg  
2015 2020 2025

Val Pro Gly Thr Ser Ala Ser Ala Thr Leu Thr Gly Leu Thr Arg  
2030 2035 2040

Gly Ala Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Val Lys Asp Gln Gln  
2045 2050 2055

Arg Gln Lys Val Arg Glu Glu Val Val Thr Val Gly Asn Ser Val  
2060 2065 2070

Asp Gln Gly Leu Ser Gln Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe Asp Pro  
2075 2080 2085

Tyr Thr Val Ser His Tyr Ala Ile Gly Glu Glu Trp Glu Arg Leu  
2090 2095 2100

Ser Asp Ser Gly Phe Lys Leu Ser Cys Gln Cys Leu Gly Phe Gly  
2105 2110 2115

Ser Gly His Phe Arg Cys Asp Ser Ser Lys Trp Cys His Asp Asn  
2120 2125 2130

Gly Val Asn Tyr Lys Ile Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly Glu  
2135 2140 2145

Asn Gly Gln Met Met Ser Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly  
2150 2155 2160

Glu Phe Lys Cys Asp Pro His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp Gly  
2165 2170 2175

Lys Thr Tyr His Val Gly Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly  
2180 2185 2190

Ala Ile Cys Ser Cys Thr Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg

2195

2200

2205

Cys Asp Asn Cys Arg Arg Pro Gly Ala Glu Pro Gly Asn Glu Gly  
2210 2215 2220

Ser Thr Ala His Ser Tyr Asn Gln Tyr Ser Gln Arg Tyr His Gln  
2225 2230 2235

Arg Thr Asn Thr Asn Val Asn Cys Pro Ile Glu Cys Phe Met Pro  
2240 2245 2250

Leu Asp Val Gln Ala Asp Arg Glu Asp Ser Arg Glu  
2255 2260 2265

<210> 12  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial

<400> 12  
AAGCAGCAGG ACUUCUCAA G

21

<210> 13  
<211> 984  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<300>  
<308> AF106007  
<309> 1999-02-08  
<313> (1)..(984)

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(984)

<400> 13  
atg gag cga agg aac cac act ggg aga gtg agt gaa ttt gtg ttg ctg 48  
Met Glu Arg Arg Asn His Thr Gly Arg Val Ser Glu Phe Val Leu Leu  
1 5 10 15

ggt ttc cca gct cct gcc cca ctg cgg gca cta cta ttt ttc ctt tct 96  
Gly Phe Pro Ala Pro Ala Pro Leu Arg Ala Leu Leu Phe Phe Leu Ser  
20 25 30

ctg ttg gcc tac gtg ttg gtg ctg act gaa aac ata ctc atc att aca Leu Leu Ala Tyr Val Leu Val Leu Thr Glu Asn Ile Leu Ile Ile Thr 35 40 45	144
gca att agg aac cac ccc acc ctc cac aaa ccc atg tat ttt ttc ttg Ala Ile Arg Asn His Pro Thr Leu His Lys Pro Met Tyr Phe Phe Leu 50 55 60	192
gct aat atg tca ttc ctg gag att tgg tat gtc act gtt acg att cct Ala Asn Met Ser Phe Leu Glu Ile Trp Tyr Val Thr Val Thr Ile Pro 65 70 75 80	240
aag atg ctt gct ggc ttc att ggt tcc gag gag aat cat gga cag ctg Lys Met Leu Ala Gly Phe Ile Gly Ser Glu Glu Asn His Gly Gln Leu 85 90 95	288
atc tcc ttt gag gca tgc atg aca cag ctc tac ttt ttc cta ggc ttg Ile Ser Phe Glu Ala Cys Met Thr Gln Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Leu 100 105 110	336
ggt tgc aca gag tgt gtc ctt ctt gct gtc atg gcc tat gac cgc tat Gly Cys Thr Glu Cys Val Leu Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr 115 120 125	384
gtg gcc atc tgt cac cca ctc cac tat cct gtc att gtc agt agc cgg Val Ala Ile Cys His Pro Leu His Tyr Pro Val Ile Val Ser Ser Arg 130 135 140	432
cta tgt gtg cag atg gca gct gga tcc tgg gct gga ggt ttt ggt atc Leu Cys Val Gln Met Ala Ala Gly Ser Trp Ala Gly Gly Phe Gly Ile 145 150 155 160	480
tcc atg gtt aaa gtt ttc ctc att tct cgc ctg tct tac tgt ggc ccc Ser Met Val Lys Val Phe Leu Ile Ser Arg Leu Ser Tyr Cys Gly Pro 165 170 175	528
aac acc atc aac cac ttt ttc tgt gat gtt tct cca ttg ctc aac ttg Asn Thr Ile Asn His Phe Phe Cys Asp Val Ser Pro Leu Leu Asn Leu 180 185 190	576
tca tgc act gac atg tcc aca gca gag ctt aca gac ttt atc ctg gcc Ser Cys Thr Asp Met Ser Thr Ala Glu Leu Thr Asp Phe Ile Leu Ala 195 200 205	624
att ttt att ctg ctg ggg cca ctc tct gtc act ggg gct tcc tat atg Ile Phe Ile Leu Leu Gly Pro Leu Ser Val Thr Gly Ala Ser Tyr Met 210 215 220	672
gcc atc aca ggt gca gtg atg cgc atc ccc tca gct gct ggc cgc cat Ala Ile Thr Gly Ala Val Met Arg Ile Pro Ser Ala Ala Gly Arg His	720

<210>	14
<211>	327
<212>	PRT
<213>	Mus musculus
<400>	14

Met Glu Arg Arg Asn His Thr Gly Arg Val Ser Glu Phe Val Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Phe Pro Ala Pro Ala Pro Leu Arg Ala Leu Leu Phe Phe Leu Ser  
20 25 30

Leu Leu Ala Tyr Val Leu Val Leu Thr Glu Asn Ile Leu Ile Ile Thr  
35 40 45

Ala Ile Arg Asn His Pro Thr Leu His Lys Pro Met Tyr Phe Phe Leu  
50 55 60

Ala Asn Met Ser Phe Leu Glu Ile Trp Tyr Val Thr Val Thr Ile Pro  
65 70 75 80

Lys Met Leu Ala Gly Phe Ile Gly Ser Glu Glu Asn His Gly Gln Leu  
85 90 95

Ile Ser Phe Glu Ala Cys Met Thr Gln Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Leu  
100 105 110

Gly Cys Thr Glu Cys Val Leu Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr  
115 120 125

Val Ala Ile Cys His Pro Leu His Tyr Pro Val Ile Val Ser Ser Arg  
130 135 140

Leu Cys Val Gln Met Ala Ala Gly Ser Trp Ala Gly Gly Phe Gly Ile  
145 150 155 160

Ser Met Val Lys Val Phe Leu Ile Ser Arg Leu Ser Tyr Cys Gly Pro  
165 170 175

Asn Thr Ile Asn His Phe Phe Cys Asp Val Ser Pro Leu Leu Asn Leu  
180 185 190

Ser Cys Thr Asp Met Ser Thr Ala Glu Leu Thr Asp Phe Ile Leu Ala  
195 200 205

Ile Phe Ile Leu Leu Gly Pro Leu Ser Val Thr Gly Ala Ser Tyr Met  
210 215 220

Ala Ile Thr Gly Ala Val Met Arg Ile Pro Ser Ala Ala Gly Arg His  
225 230 235 240

Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ala Ser His Leu Thr Val Val Ile Ile Phe  
245 250 255

Tyr Ala Ala Ser Ile Phe Ile Tyr Ala Arg Pro Lys Ala Leu Ser Ala  
260 265 270

Phe Asp Thr Asn Lys Leu Val Ser Val Leu Tyr Ala Val Ile Val Pro  
 275 280 285

Leu Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Leu Arg Asn Gln Glu Val Lys Lys  
 290 295 300

Ala Leu Arg Arg Thr Leu His Leu Ala Gln Gly Gln Asp Ala Asn Thr  
 305 310 315 320

Lys Lys Ser Ser Arg Asp Gly  
 325

<210> 15  
 <211> 1325  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> AF121972  
 <309> 1999-04-25  
 <313> (1)..(1325)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (138)..(1112)

<400> 15  
 aacacactca aatcaaaata atattggatt ggttccatct ggtttcagaa tactcttgtg 60

tttccttgta gaacttaagt ttgacactca taaaaacctt cagacatatt gaaagtaagg 120

gaattgggat taaactc atg tct ctt ttt ccc caa aga aat tta gat gcc 170  
 Met Ser Leu Phe Pro Gln Arg Asn Leu Asp Ala  
 1 5 10

atg aac aga tca gca gca cat gta acc gaa ttt gtt ctc ttg gga ttt 218  
 Met Asn Arg Ser Ala Ala His Val Thr Glu Phe Val Leu Leu Gly Phe  
 15 20 25

cct ggt tcc tgg aag ata cag att ttc ctc ttc gtg ttg ttt ttg gtg 266  
 Pro Gly Ser Trp Lys Ile Gln Ile Phe Leu Phe Val Leu Phe Leu Val  
 30 35 40



ttt tat gtc ttg aca ttg ttg gga aat gga gcc atc atc tgt gca gta Phe Tyr Val Leu Thr Leu Leu Gly Asn Gly Ala Ile Ile Cys Ala Val 45 50 55	314
aga tgt gac tca cgt cta cat acc ccc atg tac ttc ctc ctg gga aat Arg Cys Asp Ser Arg Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Leu Leu Gly Asn 60 65 70 75	362
ttt tcc ttc ctt gaa atc tgg tat gtt tcc tcc act att cct aac ata Phe Ser Phe Leu Glu Ile Trp Tyr Val Ser Ser Thr Ile Pro Asn Ile 80 85 90	410
cta gcc aac att ctg tct aag acc aag gcc atc tca ttt tca ggg tgc Leu Ala Asn Ile Leu Ser Lys Thr Lys Ala Ile Ser Phe Ser Gly Cys 95 100 105	458
ttc ctg cag ttc tat ttc ttc ttt tca ctg ggt aca act gaa tgt ctc Phe Leu Gln Phe Tyr Phe Phe Phe Ser Leu Gly Thr Thr Glu Cys Leu 110 115 120	506
ttc ctg gca gta atg gct tat gat agg tac ctg gcc att tgc cgc cca Phe Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Cys Arg Pro 125 130 135	554
tta cat tac cct act atc atg act agg agg ctg tgt tgc att ctg gta Leu His Tyr Pro Thr Ile Met Thr Arg Arg Leu Cys Cys Ile Leu Val 140 145 150 155	602
tcc tca tgc tgg ctc att gga ttt ctt ggg tac cca atc cct atc ttc Ser Ser Cys Trp Leu Ile Gly Phe Leu Gly Tyr Pro Ile Pro Ile Phe 160 165 170	650
tcc att tcc cag ctt ccc ttc tgt ggt tct aat atc att gat cac ttc Ser Ile Ser Gln Leu Pro Phe Cys Gly Ser Asn Ile Ile Asp His Phe 175 180 185	698
ctc tgt gac atg gac cca ttg atg gct ttg tcc tgt gcc cca gct cct Leu Cys Asp Met Asp Pro Leu Met Ala Leu Ser Cys Ala Pro Ala Pro 190 195 200	746
att act gaa ttt att ttt tat gcc caa agt tcc ttt gtc ctc ttt ttc Ile Thr Glu Phe Ile Phe Tyr Ala Gln Ser Ser Phe Val Leu Phe Phe 205 210 215	794
act att gca tac att ctt cgg tcc tat att ttg ttg ctc agg gct gtt Thr Ile Ala Tyr Ile Leu Arg Ser Tyr Ile Leu Leu Leu Arg Ala Val 220 225 230 235	842
ttt cag gtt cct tct gca gct ggc cga cga aaa gcc ttc tct acc tgt Phe Gln Val Pro Ser Ala Ala Gly Arg Arg Lys Ala Phe Ser Thr Cys	890

240	245	250	
ggt tcc cat tta gtt gtg gtg tca ctc ttc tat ggt aca gta atg gta			938
Gly Ser His Leu Val Val Val Ser Leu Phe Tyr Gly Thr Val Met Val			
255	260	265	
atg tat gtg agt cct aca tat ggc att cca att ttg atg cag aag atc			986
Met Tyr Val Ser Pro Thr Tyr Gly Ile Pro Ile Leu Met Gln Lys Ile			
270	275	280	
ctt aca ctt gta tac tct gta atg act cct ctc ttt aat cct ctg att			1034
Leu Thr Leu Val Tyr Ser Val Met Thr Pro Leu Phe Asn Pro Leu Ile			
285	290	295	
tat agc ctt cgt aac aag gac atg aaa ctt gct ctg aga aat gtt ttg			1082
Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Met Lys Leu Ala Leu Arg Asn Val Leu			
300	305	310	315
tta gga atg aga att gtc aaa aat atg taa ttcaaagctg tttcatactc			1132
Leu Gly Met Arg Ile Val Lys Asn Met			
320			
acatgttcta ataaagaaaa aactggagat gaatcaattc attcagttgt ctttaccctt			1192
tgttctatgt ttttgagaca ctgtctcatg tggccctggc tagcctcaaa ctcatctct			1252
agccaaggat gaccttgcaa agatcactta tgtatactct catatcatct gccaatagtg			1312
ataccttgac ctc			1325

<210> 16  
 <211> 324  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 16

Met Ser Leu Phe Pro Gln Arg Asn Leu Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala
1                      5                      10                      15

Ala His Val Thr Glu Phe Val Leu Leu Gly Phe Pro Gly Ser Trp Lys
20                      25                      30

Ile Gln Ile Phe Leu Phe Val Leu Phe Leu Val Phe Tyr Val Leu Thr
35                      40                      45

Leu Leu Gly Asn Gly Ala Ile Ile Cys Ala Val Arg Cys Asp Ser Arg  
50 55 60

Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Leu Leu Gly Asn Phe Ser Phe Leu Glu  
65 70 75 80

Ile Trp Tyr Val Ser Ser Thr Ile Pro Asn Ile Leu Ala Asn Ile Leu  
85 90 95

Ser Lys Thr Lys Ala Ile Ser Phe Ser Gly Cys Phe Leu Gln Phe Tyr  
100 105 110

Phe Phe Phe Ser Leu Gly Thr Thr Glu Cys Leu Phe Leu Ala Val Met  
115 120 125

Ala Tyr Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Cys Arg Pro Leu His Tyr Pro Thr  
130 135 140

Ile Met Thr Arg Arg Leu Cys Cys Ile Leu Val Ser Ser Cys Trp Leu  
145 150 155 160

Ile Gly Phe Leu Gly Tyr Pro Ile Pro Ile Phe Ser Ile Ser Gln Leu  
165 170 175

Pro Phe Cys Gly Ser Asn Ile Ile Asp His Phe Leu Cys Asp Met Asp  
180 185 190

Pro Leu Met Ala Leu Ser Cys Ala Pro Ala Pro Ile Thr Glu Phe Ile  
195 200 205

Phe Tyr Ala Gln Ser Ser Phe Val Leu Phe Phe Thr Ile Ala Tyr Ile  
210 215 220

Leu Arg Ser Tyr Ile Leu Leu Leu Arg Ala Val Phe Gln Val Pro Ser  
225 230 235 240

Ala Ala Gly Arg Arg Lys Ala Phe Ser Thr Cys Gly Ser His Leu Val  
245 250 255

Val Val Ser Leu Phe Tyr Gly Thr Val Met Val Met Tyr Val Ser Pro  
260 265 270

Thr Tyr Gly Ile Pro Ile Leu Met Gln Lys Ile Leu Thr Leu Val Tyr  
275 280 285

Ser Val Met Thr Pro Leu Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Ser Leu Arg Asn  
290 295 300

Lys Asp Met Lys Leu Ala Leu Arg Asn Val Leu Leu Gly Met Arg Ile  
305 310 315 320

Val Lys Asn Met

<210>	17
<211>	1134
<212>	DNA
<213>	Mus musculus

```
<300>
<308> AF121980
<309> 1999-04-25
<313> (1)..(1134)
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (99)..(99)
<223> n is a, c, g, or t
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (106)..(1056)
```

<400> 17  
ccagtccagc ctggtaggct gggcaggctc tacaggctctt tcagggaactg aacccggcat 60

cctgcccctc ccctctccct ggagcctccc tagccctcng gcgtc atg ttg ggt tgg 117  
Met Leu Gly Trp  
1

agc aat ggc acc tac aat gag tcc tac acc agc ttc ctc ctc atg ggc 165

出証特 2 0 0 4 - 3 0 6 7 5 8 1

ctg gat atg ctc ctt cta ggc acc tcc tac tcc cgc atc atc cat gct 789  
 Leu Asp Met Leu Leu Leu Gly Thr Ser Tyr Ser Arg Ile Ile His Ala  
 215 220 225

gcc ttc agg atc tca tca ggt gga gca cgg tcc aaa gcc ctg aac acc 837  
 Ala Phe Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Arg Ser Lys Ala Leu Asn Thr  
 230 235 240

tgt ggt tcc cac ctg ctg gtc atc ttc acc gtc tac tcc tcc acc atg 885  
 Cys Gly Ser His Leu Leu Val Ile Phe Thr Val Tyr Ser Ser Thr Met  
 245 250 255 260

tcc tca tcc att gtc tac cgt gtg gct cgc act gcc tcc caa gat gtg 933  
 Ser Ser Ser Ile Val Tyr Arg Val Ala Arg Thr Ala Ser Gln Asp Val  
 265 270 275

cac aac ctg ctc agt gct ttc tat ctg ttg ctc ccg tgt ctg gtc aac 981  
 His Asn Leu Leu Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Leu Pro Cys Leu Val Asn  
 280 285 290

ccc atc atc tac ggg gcc aga acc aag gaa atc agg cag cac ctg gta 1029  
 Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Thr Lys Glu Ile Arg Gln His Leu Val  
 295 300 305

agg tca ttc ctg agt gca ggc ccc tga ctctcctatg atcagtcctg 1076  
 Arg Ser Phe Leu Ser Ala Gly Pro  
 310 315

gttggcccct cagtattcct ggtgaaactg aggaaggaag aaatggagtc agagggac 1134

<210> 18  
 <211> 316  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 18

Met Leu Gly Trp Ser Asn Gly Thr Tyr Asn Glu Ser Tyr Thr Ser Phe  
 1 5 10 15

Leu Leu Met Gly Phe Pro Gly Met Gln Glu Ala Arg Ala Leu Leu Val  
 20 25 30

Leu Pro Phe Leu Ser Leu Tyr Leu Val Ile Leu Phe Thr Asn Ala Leu  
 35 40 45

Val Ile His Thr Val Ala Ser Gln Arg Ser Leu His Gln Pro Met Tyr  
50 55 60

Leu Leu Ile Ala Leu Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Ala Ala Thr Thr  
65 70 75 80

Val Leu Pro Pro Met Leu Phe Ser Phe Ser Thr Arg Phe Asn Arg Ile  
85 90 95

Ser Leu Pro Arg Cys Leu Gly Gln Met Phe Cys Ile Tyr Phe Leu Val  
100 105 110

Ser Met Asp Cys Asn Ile Leu Leu Val Met Ala Leu Asp Arg Tyr Val  
115 120 125

Ala Ile Cys Tyr Pro Leu Arg Tyr Pro Glu Ile Val Thr Gly Gln Leu  
130 135 140

Leu Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Val Thr Arg Ser Thr Ser Ile Val  
145 150 155 160

Ala Pro Val Val Val Leu Ala Ser Arg Val Arg Phe Cys Arg Ser Asp  
165 170 175

Val Ile Arg His Phe Ala Cys Glu His Met Ala Leu Met Lys Leu Ser  
180 185 190

Cys Gly Asp Ile Ser Leu Asn Lys Thr Ala Gly Leu Ile Ile Arg Thr  
195 200 205

Phe Asn Arg Val Leu Asp Met Leu Leu Leu Gly Thr Ser Tyr Ser Arg  
210 215 220

Ile Ile His Ala Ala Phe Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Arg Ser Lys  
225 230 235 240

Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Leu Leu Val Ile Phe Thr Val Tyr

255



tgc aga caa act gcg caa ctc gtg aaa ggt agg cgg atc tgg gtc gac Cys Arg Gln Thr Ala Gln Leu Val Lys Gly Arg Arg Ile Trp Val Asp 20 25 30	392
tct agg cct cac tgg cct aat acg act cac tat agg gag ctc gag gat Ser Arg Pro His Trp Pro Asn Thr Thr His Tyr Arg Glu Leu Glu Asp 35 40 45 50	440
cag cat gtt tgg att gct att ccc ttc tgc tcc atg tac atc ctt gct Gln His Val Trp Ile Ala Ile Pro Phe Cys Ser Met Tyr Ile Leu Ala 55 60 65	488
ctg gtt gga aat ggt acc atc ctc tat atc att ata aca gac agg gct Leu Val Gly Asn Gly Thr Ile Leu Tyr Ile Ile Ile Thr Asp Arg Ala 70 75 80	536
ctc cat gag cca atg tac ctc ttc ttg tgt ctg ctt tct atc act gat Leu His Glu Pro Met Tyr Leu Phe Leu Cys Leu Leu Ser Ile Thr Asp 85 90 95	584
ctg gtt ctc tgt tca aca aca ttg cct aaa atg ctg gca ata ttc tgg Leu Val Leu Cys Ser Thr Thr Leu Pro Lys Met Leu Ala Ile Phe Trp 100 105 110	632
ctc aga tcc cat gtc att tcc tac cat ggc tgc ctc act cag atg ttt Leu Arg Ser His Val Ile Ser Tyr His Gly Cys Leu Thr Gln Met Phe 115 120 125 130	680
ttt gta cat gca gtc ttt gcc aca gag tca gct gtt ctg ctg gcc atg Phe Val His Ala Val Phe Ala Thr Glu Ser Ala Val Leu Leu Ala Met 135 140 145	728
gct ttt gat cga tat gtt gct atc tgc aga cca ctc cac tat aca tcc Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Arg Pro Leu His Tyr Thr Ser 150 155 160	776
atc ctc aat gct gtt gta att ggg aag att ggc ctg gca tgc gtg act Ile Leu Asn Ala Val Val Ile Gly Lys Ile Gly Leu Ala Cys Val Thr 165 170 175	824
cgt ggc ctt ctc ttt gtc ttc ccc ttt gtc att ctc att gaa cgt tta Arg Gly Leu Leu Phe Val Phe Pro Phe Val Ile Leu Ile Glu Arg Leu 180 185 190	872
ccc ttc tgt gga cat cat ata atc cct cac act tac tgt gag cac atg Pro Phe Cys Gly His His Ile Ile Pro His Thr Tyr Cys Glu His Met 195 200 205 210	920
ggc ata gcc aag ctc gcc tgt gcc agc atc aag cct aac acc atc tat	968

Gly Ile Ala Lys Leu Ala Cys Ala Ser Ile Lys Pro Asn Thr Ile Tyr  
 215 220 225  
 ggt ctt act gta gca ctt tca gtc act ggc atg gat gtg gtc ctc att 1016  
 Gly Leu Thr Val Ala Leu Ser Val Thr Gly Met Asp Val Val Leu Ile  
 230 235 240  
 gca acc tcc tac atc ctg att ctg cag gcc gtg ctg cga ctg ccc tca 1064  
 Ala Thr Ser Tyr Ile Leu Ile Leu Gln Ala Val Leu Arg Leu Pro Ser  
 245 250 255  
 aag gat gcc cag ttc cga gca ttc agc aca tgt gga gcc cac att tgt 1112  
 Lys Asp Ala Gln Phe Arg Ala Phe Ser Thr Cys Gly Ala His Ile Cys  
 260 265 270  
 gta att ctt gtc ttc tat atc ccc gca ttc ttt tca ttt ttc act cac 1160  
 Val Ile Leu Val Phe Tyr Ile Pro Ala Phe Phe Ser Phe Phe Thr His  
 275 280 285 290  
 cgc ttt ggt cac cac gtg cct cct cag gta cac atc ata ctt gca aat 1208  
 Arg Phe Gly His His Val Pro Pro Gln Val His Ile Ile Leu Ala Asn  
 295 300 305  
 ctt tat ctc ctt gtg cct cct gtt ctc aac ccc cta gtc tat ggc atc 1256  
 Leu Tyr Leu Leu Val Pro Pro Val Leu Asn Pro Leu Val Tyr Gly Ile  
 310 315 320  
 aat acc aaa caa atc cgc ctg aga ata ctt gac ttt ttt gta aag aga 1304  
 Asn Thr Lys Gln Ile Arg Leu Arg Ile Leu Asp Phe Phe Val Lys Arg  
 325 330 335  
 agg tga caataatctc cacatatacc aaaggctaag gagttcctgg ctttagtttg 1360  
 Arg  
 ctgcttctgc tgatctcagt aagtcagtgt atgtacattt aagattttga gatctagagc 1420  
 a 1421

<210> 20  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 20

Met Pro Glu Lys Met Leu Ser Lys Leu Ile Ala Tyr Leu Leu Leu Ile  
 1 5 10 15

Glu Ser Cys Arg Gln Thr Ala Gln Leu Val Lys Gly Arg Arg Ile Trp  
20 25 30

Val Asp Ser Arg Pro His Trp Pro Asn Thr Thr His Tyr Arg Glu Leu  
35 40 45

Glu Asp Gln His Val Trp Ile Ala Ile Pro Phe Cys Ser Met Tyr Ile  
50 55 60

Leu Ala Leu Val Gly Asn Gly Thr Ile Leu Tyr Ile Ile Ile Thr Asp  
65 70 75 80

Arg Ala Leu His Glu Pro Met Tyr Leu Phe Leu Cys Leu Leu Ser Ile  
85 90 95

Thr Asp Leu Val Leu Cys Ser Thr Thr Leu Pro Lys Met Leu Ala Ile  
100 105 110

Phe Trp Leu Arg Ser His Val Ile Ser Tyr His Gly Cys Leu Thr Gln  
115 120 125

Met Phe Phe Val His Ala Val Phe Ala Thr Glu Ser Ala Val Leu Leu  
130 135 140

Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Arg Pro Leu His Tyr  
145 150 155 160

Thr Ser Ile Leu Asn Ala Val Val Ile Gly Lys Ile Gly Leu Ala Cys  
165 170 175

Val Thr Arg Gly Leu Leu Phe Val Phe Pro Phe Val Ile Leu Ile Glu  
180 185 190

Arg Leu Pro Phe Cys Gly His His Ile Ile Pro His Thr Tyr Cys Glu  
195 200 205

His Met Gly Ile Ala Lys Leu Ala Cys Ala Ser Ile Lys Pro Asn Thr

210

215

220

Ile Tyr Gly Leu Thr Val Ala Leu Ser Val Thr Gly Met Asp Val Val  
225 230 235 240

Leu Ile Ala Thr Ser Tyr Ile Leu Ile Leu Gln Ala Val Leu Arg Leu  
245 250 255

Pro Ser Lys Asp Ala Gln Phe Arg Ala Phe Ser Thr Cys Gly Ala His  
260 265 270

Ile Cys Val Ile Leu Val Phe Tyr Ile Pro Ala Phe Phe Ser Phe Phe  
275 280 285

Thr His Arg Phe Gly His His Val Pro Pro Gln Val His Ile Ile Leu  
290 295 300

Ala Asn Leu Tyr Leu Leu Val Pro Pro Val Leu Asn Pro Leu Val Tyr  
305 310 315 320

Gly Ile Asn Thr Lys Gln Ile Arg Leu Arg Ile Leu Asp Phe Phe Val  
325 330 335

Lys Arg Arg

<210> 21  
<211> 930  
<212> DNA  
<213> M. musculus

<300>  
<308> X92969  
<309> 1996-07-01  
<313> (1)..(930)

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(930)

<400> 21  
 atg cag aga aat aac ttc act gaa gtg ata gag ttc gtc ttc ctg gga 48  
 Met Gln Arg Asn Asn Phe Thr Glu Val Ile Glu Phe Val Phe Leu Gly  
 1 5 10 15

ttc tcc agc ttt gga aag cat cag ata acc ctc ttt gtg gtt ttc cta 96  
 Phe Ser Ser Phe Gly Lys His Gln Ile Thr Leu Phe Val Val Phe Leu  
 20 25 30

acc atc tac att tta act ctg gct ggc aac atc att ata gtg aca atc 144  
 Thr Ile Tyr Ile Leu Thr Leu Ala Gly Asn Ile Ile Ile Val Thr Ile  
 35 40 45

aca cac ata gac cac cac ctt cac act ccc atg tac ttc ttt ctg agc 192  
 Thr His Ile Asp His His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser  
 50 55 60

atg ttg gca agc tca gag act gtg tac aca ctg gtc att gtc cca cga 240  
 Met Leu Ala Ser Ser Glu Thr Val Tyr Thr Leu Val Ile Val Pro Arg  
 65 70 75 80

atg ctt tcc agc ctg att ttt tac aac ctt ccc ata tcc ttg gca ggc 288  
 Met Leu Ser Ser Leu Ile Phe Tyr Asn Leu Pro Ile Ser Leu Ala Gly  
 85 90 95

tgc gca acc caa atg ttc ttt ttt gtc act ttg gcc acc aac aac tgc 336  
 Cys Ala Thr Gln Met Phe Phe Phe Val Thr Leu Ala Thr Asn Asn Cys  
 100 105 110

ttt ctg ctc aca gca atg ggt tat gat cgt tat gtg gct att tgt aat 384  
 Phe Leu Leu Thr Ala Met Gly Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn  
 115 120 125

cct ctg aga tat aca atc atc atg agc aag gga atg tgt gcc ttg ttg 432  
 Pro Leu Arg Tyr Thr Ile Ile Met Ser Lys Gly Met Cys Ala Leu Leu  
 130 135 140

gtc tgt ggg tct tta ggc act ggc ctg gtt atg gca gtt ctt cat gtg 480  
 Val Cys Gly Ser Leu Gly Thr Gly Leu Val Met Ala Val Leu His Val  
 145 150 155 160

cca gcc atg ttc cat ttg ccc ttt tgt ggc acg gtg gtg gag cac ttt 528  
 Pro Ala Met Phe His Leu Pro Phe Cys Gly Thr Val Val Glu His Phe  
 165 170 175

ttc tgt gac ata tac cca gta atg aag ctt tct tgt gtt gat acc act 576  
 Phe Cys Asp Ile Tyr Pro Val Met Lys Leu Ser Cys Val Asp Thr Thr  
 180 185 190

gtc aat gag ata atc aat tat ggt gta agt tca ttt gta att ctt gtg 624

Val	Asn	Glu	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gly	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Ile	Leu	Val		
	195						200					205					
ccc	ata	ggg	ctg	ata	ttt	atc	tcc	tat	gtg	ctc	att	gtc	tct	tcc	atc		672
Pro	Ile	Gly	Leu	Ile	Phe	Ile	Ser	Tyr	Val	Leu	Ile	Val	Ser	Ser	Ile		
	210					215					220						
ctt	aaa	att	gtg	tcc	act	gaa	ggc	cag	aag	aaa	gcc	ttt	gcc	acc	tgt		720
Leu	Lys	Ile	Val	Ser	Thr	Glu	Gly	Gln	Lys	Lys	Ala	Phe	Ala	Thr	Cys		
	225				230					235					240		
gcc	tct	cat	ctc	act	gtg	gtc	att	gtc	cac	tat	ggc	tgt	gcc	tcc	att		768
Ala	Ser	His	Leu	Thr	Val	Val	Ile	Val	His	Tyr	Gly	Cys	Ala	Ser	Ile		
				245				250						255			
gcc	tac	ctc	aaa	ccc	aaa	tca	gaa	agt	tca	gta	gaa	aaa	gac	ctt	ctt		816
Ala	Tyr	Leu	Lys	Pro	Lys	Ser	Glu	Ser	Ser	Val	Glu	Lys	Asp	Leu	Leu		
		260						265					270				
ctc	tct	gtg	acc	tac	act	atc	atc	act	ccc	ttg	ctg	aac	cct	gtt	gtc		864
Leu	Ser	Val	Thr	Tyr	Thr	Ile	Ile	Thr	Pro	Leu	Leu	Asn	Pro	Val	Val		
		275					280					285					
tac	agc	ctc	agg	aac	aaa	gaa	gtc	aaa	gat	gct	cta	tgc	aga	gct	gtg		912
Tyr	Ser	Leu	Arg	Asn	Lys	Glu	Val	Lys	Asp	Ala	Leu	Cys	Arg	Ala	Val		
	290					295				300							
ggc	aga	aac	act	tct	taa												930
Gly	Arg	Asn	Thr	Ser													
	305																

<210> 22  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> M.musculus

<400> 22

Met	Gln	Arg	Asn	Asn	Phe	Thr	Glu	Val	Ile	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gly
1				5					10					15	

Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Lys	His	Gln	Ile	Thr	Leu	Phe	Val	Val	Phe	Leu
			20					25					30		

Thr	Ile	Tyr	Ile	Leu	Thr	Leu	Ala	Gly	Asn	Ile	Ile	Ile	Val	Thr	Ile
			35				40					45			

Thr His Ile Asp His His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser  
50 55 60

Met Leu Ala Ser Ser Glu Thr Val Tyr Thr Leu Val Ile Val Pro Arg  
65 70 75 80

Met Leu Ser Ser Leu Ile Phe Tyr Asn Leu Pro Ile Ser Leu Ala Gly  
85 90 95

Cys Ala Thr Gln Met Phe Phe Phe Val Thr Leu Ala Thr Asn Asn Cys  
100 105 110

Phe Leu Leu Thr Ala Met Gly Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn  
115 120 125

Pro Leu Arg Tyr Thr Ile Ile Met Ser Lys Gly Met Cys Ala Leu Leu  
130 135 140

Val Cys Gly Ser Leu Gly Thr Gly Leu Val Met Ala Val Leu His Val  
145 150 155 160

Pro Ala Met Phe His Leu Pro Phe Cys Gly Thr Val Val Glu His Phe  
165 170 175

Phe Cys Asp Ile Tyr Pro Val Met Lys Leu Ser Cys Val Asp Thr Thr  
180 185 190

Val Asn Glu Ile Ile Asn Tyr Gly Val Ser Ser Phe Val Ile Leu Val  
195 200 205

Pro Ile Gly Leu Ile Phe Ile Ser Tyr Val Leu Ile Val Ser Ser Ile  
210 215 220

Leu Lys Ile Val Ser Thr Glu Gly Gln Lys Lys Ala Phe Ala Thr Cys  
225 230 235 240

Ala Ser His Leu Thr Val Val Ile Val His Tyr Gly Cys Ala Ser Ile

245

250

255

Ala Tyr Leu Lys Pro Lys Ser Glu Ser Ser Val Glu Lys Asp Leu Leu  
                   260                                  265                                  270

Leu Ser Val Thr Tyr Thr Ile Ile Thr Pro Leu Leu Asn Pro Val Val  
                   275                                  280                                  285

Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Glu Val Lys Asp Ala Leu Cys Arg Ala Val  
                   290                                  295                                  300

Gly Arg Asn Thr Ser  
 305

<210> 23  
 <211> 957  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> AB061229  
 <309> 2001-09-07  
 <313> (1)..(957)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(957)

<400> 23  
 atg ata ctg tct gaa aaa aac aat agt ggg att att ttc acc ctc ttg 48  
 Met Ile Leu Ser Glu Lys Asn Asn Ser Gly Ile Ile Phe Thr Leu Leu  
 1                                  5                                  10                                  15  
 ggc ttc tca gat tat cct gac ctt aaa gtc cct ctc ttc ttg gtg ttt 96  
 Gly Phe Ser Asp Tyr Pro Asp Leu Lys Val Pro Leu Phe Leu Val Phe  
                   20                                  25                                  30  
 ctc gtc att tac agc atc act gtg gta gga aat att ggt atg atc ctc 144  
 Leu Val Ile Tyr Ser Ile Thr Val Val Gly Asn Ile Gly Met Ile Leu  
                   35                                  40                                  45  
 gtg atc aga att aat ccc caa ctg cac tcc cct atg tac ttc ttc ctc 192  
 Val Ile Arg Ile Asn Pro Gln Leu His Ser Pro Met Tyr Phe Phe Leu  
                   50                                  55                                  60



出証特 2004-3067581

Leu Phe Leu Phe Cys Val Pro Asn Ser Lys Asn Ser Arg Leu Thr Val  
260 265 270

aaa gtg ggc tct gtg ttt tac aca gtg gtg atc ccc atg ctt aac ccc 864  
Lys Val Gly Ser Val Phe Tyr Thr Val Val Ile Pro Met Leu Asn Pro  
275 280 285

ata atc tat agt ctg aga aat aag gat gtc caa gat act att aga aaa 912  
Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Gln Asp Thr Ile Arg Lys  
290 295 300

ata atg acc ctt atc tca tgt gtt aag aat gat aga cac aat taa 957  
Ile Met Thr Leu Ile Ser Cys Val Lys Asn Asp Arg His Asn  
305 310 315

<210> 24  
<211> 318  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 24

Met Ile Leu Ser Glu Lys Asn Asn Ser Gly Ile Ile Phe Thr Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Phe Ser Asp Tyr Pro Asp Leu Lys Val Pro Leu Phe Leu Val Phe  
20 25 30

Leu Val Ile Tyr Ser Ile Thr Val Val Gly Asn Ile Gly Met Ile Leu  
35 40 45

Val Ile Arg Ile Asn Pro Gln Leu His Ser Pro Met Tyr Phe Phe Leu  
50 55 60

Ser His Leu Ser Phe Val Asp Phe Cys Tyr Ser Ser Ile Ile Ala Pro  
65 70 75 80

Lys Met Leu Val Asn Leu Val Ala Lys Asp Ile Thr Ile Ser Phe Val  
85 90 95

Glu Cys Ile Val Gln Tyr Phe Leu Phe Cys Val Phe Val Val Thr Glu  
100 105 110

Ala Phe Leu Leu Val Val Met Ala Tyr Asp Arg Phe Val Ala Ile Cys  
115 120 125

Asn Pro Leu Leu Tyr Thr Val Ala Met Ser Gln Lys Leu Cys Ile Thr  
130 135 140

Leu Val Val Gly Ser Tyr Ala Trp Gly Phe Thr Cys Ser Leu Thr Leu  
145 150 155 160

Thr Cys Ser Thr Val Gln Leu Ser Phe His Gly Val Asn Arg Ile Asp  
165 170 175

His Phe Phe Cys Glu Leu Ser Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ser Asp  
180 185 190

Thr Leu Ile Ser Gln Leu Leu Leu Phe Val Phe Ala Thr Phe Asn Ala  
195 200 205

Val Ser Thr Leu Leu Leu Ile Leu Leu Ser Tyr Leu Phe Ile Val Val  
210 215 220

Thr Val Leu Lys Met Arg Ser Ala Ser Gly Arg Arg Lys Ala Phe Ser  
225 230 235 240

Thr Cys Ala Ser His Leu Ala Ala Ile Thr Ile Phe His Gly Thr Ile  
245 250 255

Leu Phe Leu Phe Cys Val Pro Asn Ser Lys Asn Ser Arg Leu Thr Val  
260 265 270

Lys Val Gly Ser Val Phe Tyr Thr Val Val Ile Pro Met Leu Asn Pro  
275 280 285

Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Gln Asp Thr Ile Arg Lys  
290 295 300

Ile Met Thr Leu Ile Ser Cys Val Lys Asn Asp Arg His Asn

305

310

315

<210> 25  
 <211> 1344  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> AJ133424  
 <309> 2003-02-01  
 <313> (1)..(1344)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (61)..(1020)

<400> 25  
 ggaggaagac aatgttgatg ctgattgctg agttcctgca ggtttcaaac cgaatgtacc 60

atg gac aga tcc aat gag acc gcc ccc ctg tcc ggc ttc att ctc ctg 108  
 Met Asp Arg Ser Asn Glu Thr Ala Pro Leu Ser Gly Phe Ile Leu Leu  
 1 5 10 15

ggc ctc tct gcc cac cca aag ctg gag aaa acc ttc ttc gtg ctc atc 156  
 Gly Leu Ser Ala His Pro Lys Leu Glu Lys Thr Phe Phe Val Leu Ile  
 20 25 30

ctg atg atg tac ctg gtg atc ctg ctg ggc aac ggc gtc ctc atc ctg 204  
 Leu Met Met Tyr Leu Val Ile Leu Leu Gly Asn Gly Val Leu Ile Leu  
 35 40 45

gtg agc atc ctc gac tcc cac ctg cac acg ccc atg tac ttc ttc ctg 252  
 Val Ser Ile Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu  
 50 55 60

ggg aac ctc tcc ttc ctg gac atc tgc tac act acc tcc tct gtc ccc 300  
 Gly Asn Leu Ser Phe Leu Asp Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ser Val Pro  
 65 70 75 80

ctc att ctg gac agc ttt ctg act ccc agg aag acc atc tcc ttc tcg 348  
 Leu Ile Leu Asp Ser Phe Leu Thr Pro Arg Lys Thr Ile Ser Phe Ser  
 85 90 95

ggc tgt gcc gtg cag atg ttt ctc tcc ttc gcc atg gga gcc acg gag 396  
 Gly Cys Ala Val Gln Met Phe Leu Ser Phe Ala Met Gly Ala Thr Glu  
 100 105 110

tgt gtg ctc ctg agt atg atg gcg ttt gat cgt tat gtg gcc atc tgc 444

Cys Val Leu Leu Ser Met Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys	
115 120 125	
aac ccc ctt aga tat cct gtg gtc atg aac aag gct gcc tat gtg ccc	492
Asn Pro Leu Arg Tyr Pro Val Val Met Asn Lys Ala Ala Tyr Val Pro	
130 135 140	
atg gct gcc agt tcc tgg gca ggt ggt atc act aat tct gta gtg cag	540
Met Ala Ala Ser Ser Trp Ala Gly Gly Ile Thr Asn Ser Val Val Gln	
145 150 155 160	
aca tct ttg gca atg cgg ctg ccc ttc tgt ggg gac aat gtc atc aat	588
Thr Ser Leu Ala Met Arg Leu Pro Phe Cys Gly Asp Asn Val Ile Asn	
165 170 175	
cac ttc acc tgt gag atc ctg gca gtc ctg aaa ctg gcc tgt gct gac	636
His Phe Thr Cys Glu Ile Leu Ala Val Leu Lys Leu Ala Cys Ala Asp	
180 185 190	
atc tcc atc aat gtc atc agc atg gtt gtg gcc aac atg atc ttc ttg	684
Ile Ser Ile Asn Val Ile Ser Met Val Val Ala Asn Met Ile Phe Leu	
195 200 205	
gca gtc cca gtc ctc ttc atc ttt gtc tcc tat gtc ttc atc ctt gtg	732
Ala Val Pro Val Leu Phe Ile Phe Val Ser Tyr Val Phe Ile Leu Val	
210 215 220	
aca atc ctg agg atc ccc tct gct gag ggg agg aag aag gcc ttc tcc	780
Thr Ile Leu Arg Ile Pro Ser Ala Glu Gly Arg Lys Lys Ala Phe Ser	
225 230 235 240	
acc tgc tct gcc cac ctc acc gtg gta ctt gtc ttc tat gga acc atc	828
Thr Cys Ser Ala His Leu Thr Val Val Leu Val Phe Tyr Gly Thr Ile	
245 250 255	
ctc ttc atg tac ggg aag ccc aag tcc aag gac cca ctg ggg gca gac	876
Leu Phe Met Tyr Gly Lys Pro Lys Ser Lys Asp Pro Leu Gly Ala Asp	
260 265 270	
aag cag gac ctt gca gac aag ctc atc tcc ctc ttc tat gga gtg gtg	924
Lys Gln Asp Leu Ala Asp Lys Leu Ile Ser Leu Phe Tyr Gly Val Val	
275 280 285	
acc ccc atg cta aac ccc atc atc tac agc ttg aga aac aag gac gtg	972
Thr Pro Met Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val	
290 295 300	
agg gct gct gtg agg aac ctg gtg ggc cag aaa cac cta act gag tga	1020
Arg Ala Ala Val Arg Asn Leu Val Gly Gln Lys His Leu Thr Glu	
305 310 315	

ctgtcacagt gcagaacttc caacctcttc attgtgtttg tgagggaaga gtggtgcaat 1080  
 gaagaggagc cacttcccca aggtccaagt aatgaactca gaactaagac tataaacaaa 1140  
 ctatcaacgt tccttaagca ccaatgcttc tagttaacag gctggaagga caagccttta 1200  
 cacctttgga gagaatggct ggttgtcagc tttgtgttca accttagtgg cgtcgtagaa 1260  
 ctactctttc atgaccagag gctggcacag atctctggaa agatgctgac atgcataact 1320  
 aggagacaga tgcaaagcct gggtt 1344

<210> 26  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 26

Met Asp Arg Ser Asn Glu Thr Ala Pro Leu Ser Gly Phe Ile Leu Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala His Pro Lys Leu Glu Lys Thr Phe Phe Val Leu Ile  
 20 25 30

Leu Met Met Tyr Leu Val Ile Leu Leu Gly Asn Gly Val Leu Ile Leu  
 35 40 45

Val Ser Ile Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu  
 50 55 60

Gly Asn Leu Ser Phe Leu Asp Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ser Val Pro  
 65 70 75 80

Leu Ile Leu Asp Ser Phe Leu Thr Pro Arg Lys Thr Ile Ser Phe Ser  
 85 90 95

Gly Cys Ala Val Gln Met Phe Leu Ser Phe Ala Met Gly Ala Thr Glu  
 100 105 110

Cys Val Leu Leu Ser Met Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys

115	120	125
Asn Pro Leu Arg Tyr Pro Val Val Met Asn Lys Ala Ala Tyr Val Pro		
130	135	140
Met Ala Ala Ser Ser Trp Ala Gly Gly Ile Thr Asn Ser Val Val Gln		
145	150	155
		160
Thr Ser Leu Ala Met Arg Leu Pro Phe Cys Gly Asp Asn Val Ile Asn		
	165	170
		175
His Phe Thr Cys Glu Ile Leu Ala Val Leu Lys Leu Ala Cys Ala Asp		
	180	185
		190
Ile Ser Ile Asn Val Ile Ser Met Val Val Ala Asn Met Ile Phe Leu		
	195	200
		205
Ala Val Pro Val Leu Phe Ile Phe Val Ser Tyr Val Phe Ile Leu Val		
	210	215
		220
Thr Ile Leu Arg Ile Pro Ser Ala Glu Gly Arg Lys Lys Ala Phe Ser		
225	230	235
		240
Thr Cys Ser Ala His Leu Thr Val Val Leu Val Phe Tyr Gly Thr Ile		
	245	250
		255
Leu Phe Met Tyr Gly Lys Pro Lys Ser Lys Asp Pro Leu Gly Ala Asp		
	260	265
		270
Lys Gln Asp Leu Ala Asp Lys Leu Ile Ser Leu Phe Tyr Gly Val Val		
	275	280
		285
Thr Pro Met Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val		
	290	295
		300
Arg Ala Ala Val Arg Asn Leu Val Gly Gln Lys His Leu Thr Glu		
305	310	315

<210> 27  
 <211> 942  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> AF102523  
 <309> 1999-02-08  
 <313> (1)..(942)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(942)

<400> 27  
 atg gcg aac agc act act gtt act gag ttt att ttg ctg ggg ctg tca 48  
 Met Ala Asn Ser Thr Thr Val Thr Glu Phe Ile Leu Leu Gly Leu Ser  
 1 5 10 15  
 gat gcc tgt gag ctg cag gtg ctc ata ttc ctg ggc ttt ctc ctg acc 96  
 Asp Ala Cys Glu Leu Gln Val Leu Ile Phe Leu Gly Phe Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 tac ttc ctc att ctg ctg gga aac ttc ctc atc atc ttc atc acc ctt 144  
 Tyr Phe Leu Ile Leu Leu Gly Asn Phe Leu Ile Ile Phe Ile Thr Leu  
 35 40 45  
 gtg gac agg cgc ctt tac acc ccc atg tat tac ttc ctc cgc aac ttt 192  
 Val Asp Arg Arg Leu Tyr Thr Pro Met Tyr Tyr Phe Leu Arg Asn Phe  
 50 55 60  
 gcc atg ctg gag atc tgg ttc acc tct gtc atc ttc ccc aag atg cta 240  
 Ala Met Leu Glu Ile Trp Phe Thr Ser Val Ile Phe Pro Lys Met Leu  
 65 70 75 80  
 acc aac atc atc aca gga cat aag acc atc tcc cta cta ggt tgt ttc 288  
 Thr Asn Ile Ile Thr Gly His Lys Thr Ile Ser Leu Leu Gly Cys Phe  
 85 90 95  
 ctc caa gca ttc ctc tat ttc ttc ctt ggc acc act gag ttc ttt cta 336  
 Leu Gln Ala Phe Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Thr Thr Glu Phe Phe Leu  
 100 105 110  
 ctg gca gtg atg tcc ttt gac agg tat gtg gcc att tgt aac cct ttg 384  
 Leu Ala Val Met Ser Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn Pro Leu  
 115 120 125  
 cgt tat gcc acc att atg agc aaa aga gtc tgt gtc cag ctt gtg ttt 432



Arg Tyr Ala Thr Ile Met Ser Lys Arg Val Cys Val Gln Leu Val Phe	
130 135 140	
tgc tca tgg atg tct gga ttg ctt ctc atc ata gtt cct agt tca att	480
Cys Ser Trp Met Ser Gly Leu Leu Leu Ile Ile Val Pro Ser Ser Ile	
145 150 155 160	
gta ttt cag cag cca ttc tgt ggc cca aac atc att aat cat ttc ttc	528
Val Phe Gln Gln Pro Phe Cys Gly Pro Asn Ile Ile Asn His Phe Phe	
165 170 175	
tgt gac aac ttt cca ctt atg gaa ctc ata tgt gca gat act agc ctg	576
Cys Asp Asn Phe Pro Leu Met Glu Leu Ile Cys Ala Asp Thr Ser Leu	
180 185 190	
gta gag ttc ctg ggt ttt gtt att gcc aat ttc agc ctc ctg ggc act	624
Val Glu Phe Leu Gly Phe Val Ile Ala Asn Phe Ser Leu Leu Gly Thr	
195 200 205	
ctg gct gtg act gcc acc tgc tat ggc cac att ctc tat acc att cta	672
Leu Ala Val Thr Ala Thr Cys Tyr Gly His Ile Leu Tyr Thr Ile Leu	
210 215 220	
cac att cct tca gcc aag gag agg aag aaa gcc ttc tca act tgc tcc	720
His Ile Pro Ser Ala Lys Glu Arg Lys Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ser	
225 230 235 240	
tct cat att att gtg gtg tct ctc ttc tac ggc agc tgt atc ttc atg	768
Ser His Ile Ile Val Val Ser Leu Phe Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Met	
245 250 255	
tat gtc cgg tct ggc aag aat gga cag ggg gag gat cat aac aag gtg	816
Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asn Gly Gln Gly Glu Asp His Asn Lys Val	
260 265 270	
gtg gca ttg ctc aac act gta gtg aca ccc aca ctc aac ccc ttc atc	864
Val Ala Leu Leu Asn Thr Val Val Thr Pro Thr Leu Asn Pro Phe Ile	
275 280 285	
tac act ctg agg aac aag cag gtg aag cag gta ttt agg gaa cac gta	912
Tyr Thr Leu Arg Asn Lys Gln Val Lys Gln Val Phe Arg Glu His Val	
290 295 300	
agc aag ttc caa aag ttc agc cag acg tga	942
Ser Lys Phe Gln Lys Phe Ser Gln Thr	
305 310	

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 313

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 28

Met Ala Asn Ser Thr Thr Val Thr Glu Phe Ile Leu Leu Gly Leu Ser  
 1 5 10 15

Asp Ala Cys Glu Leu Gln Val Leu Ile Phe Leu Gly Phe Leu Leu Thr  
 20 25 30

Tyr Phe Leu Ile Leu Leu Gly Asn Phe Leu Ile Ile Phe Ile Thr Leu  
 35 40 45

Val Asp Arg Arg Leu Tyr Thr Pro Met Tyr Tyr Phe Leu Arg Asn Phe  
 50 55 60

Ala Met Leu Glu Ile Trp Phe Thr Ser Val Ile Phe Pro Lys Met Leu  
 65 70 75 80

Thr Asn Ile Ile Thr Gly His Lys Thr Ile Ser Leu Leu Gly Cys Phe  
 85 90 95

Leu Gln Ala Phe Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Thr Thr Glu Phe Phe Leu  
 100 105 110

Leu Ala Val Met Ser Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn Pro Leu  
 115 120 125

Arg Tyr Ala Thr Ile Met Ser Lys Arg Val Cys Val Gln Leu Val Phe  
 130 135 140

Cys Ser Trp Met Ser Gly Leu Leu Leu Ile Ile Val Pro Ser Ser Ile  
 145 150 155 160

Val Phe Gln Gln Pro Phe Cys Gly Pro Asn Ile Ile Asn His Phe Phe  
 165 170 175

Cys Asp Asn Phe Pro Leu Met Glu Leu Ile Cys Ala Asp Thr Ser Leu

180

185

190

Val Glu Phe Leu Gly Phe Val Ile Ala Asn Phe Ser Leu Leu Gly Thr  
 195 200 205

Leu Ala Val Thr Ala Thr Cys Tyr Gly His Ile Leu Tyr Thr Ile Leu  
 210 215 220

His Ile Pro Ser Ala Lys Glu Arg Lys Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ser  
 225 230 235 240

Ser His Ile Ile Val Val Ser Leu Phe Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Met  
 245 250 255

Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asn Gly Gln Gly Glu Asp His Asn Lys Val  
 260 265 270

Val Ala Leu Leu Asn Thr Val Val Thr Pro Thr Leu Asn Pro Phe Ile  
 275 280 285

Tyr Thr Leu Arg Asn Lys Gln Val Lys Gln Val Phe Arg Glu His Val  
 290 295 300

Ser Lys Phe Gln Lys Phe Ser Gln Thr  
 305 310

<210> 29  
 <211> 669  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> AF102531  
 <309> 1999-02-08  
 <313> (1).. (669)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (669)

<400> 29	
tgc aac tta gcg acc atg gat att atc tgc acc tcc tct gta ctg ccc	48
Cys Asn Leu Ala Thr Met Asp Ile Ile Cys Thr Ser Ser Val Leu Pro	
1 5 10 15	
aag gcg ctg gtt ggt cta ctg tct gag gaa aac acc acc tcc ttc aaa	96
Lys Ala Leu Val Gly Leu Leu Ser Glu Glu Asn Thr Thr Ser Phe Lys	
20 25 30	
ggg tgc atg act cag ctc ttc ttt ctt gtg tgg tct gga tcc tct gag	144
Gly Cys Met Thr Gln Leu Phe Phe Leu Val Trp Ser Gly Ser Ser Glu	
35 40 45	
ctg ctg ctg ctc aca gtc atg gcc tat gac cgc tat gtg gcc atc tgt	192
Leu Leu Leu Leu Thr Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys	
50 55 60	
ttg ccc ctg cat tac agc tct agg atg agt cca cag ctc tgt ggg acc	240
Leu Pro Leu His Tyr Ser Ser Arg Met Ser Pro Gln Leu Cys Gly Thr	
65 70 75 80	
ttt gcc gtg ggt gta tgg tcc atc tgc gca cta aat gca tct atc aac	288
Phe Ala Val Gly Val Trp Ser Ile Cys Ala Leu Asn Ala Ser Ile Asn	
85 90 95	
act ggt ctg atg aca cgg ctg tca ttc tgt ggc ccc aag gtc atc acc	336
Thr Gly Leu Met Thr Arg Leu Ser Phe Cys Gly Pro Lys Val Ile Thr	
100 105 110	
cac ttc ttc tgt gag att ccc cca ctc ctc ctg ctc tcc tgt agt cct	384
His Phe Phe Cys Glu Ile Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ser Pro	
115 120 125	
aca tat ata aat agc gtt atg act ctt gtg gca gat gcc ttt tat gga	432
Thr Tyr Ile Asn Ser Val Met Thr Leu Val Ala Asp Ala Phe Tyr Gly	
130 135 140	
ggc atc aat ttt tta ctt acc ttg cta tcc tat ggc tgc atc att gcc	480
Gly Ile Asn Phe Leu Leu Thr Leu Leu Ser Tyr Gly Cys Ile Ile Ala	
145 150 155 160	
agc atc ctg cgc atg cgt tct gct gag ggc aag agg aag gcc ttt tct	528
Ser Ile Leu Arg Met Arg Ser Ala Glu Gly Lys Arg Lys Ala Phe Ser	
165 170 175	
acc tgc tca tcc cac ctc att gtg gtc tct gtg tac tac tca tct gtg	576
Thr Cys Ser Ser His Leu Ile Val Val Ser Val Tyr Tyr Ser Ser Val	
180 185 190	
ttc tgt gcc tat gtc agc cct gct tct agc tac agc cca gaa aga agc	624

Phe Cys Ala Tyr Val Ser Pro Ala Ser Ser Tyr Ser Pro Glu Arg Ser  
195 200 205

aaa gtt tcc tca gtg ctg tac tca gtc ctc agc cca acc ctc aac 669  
Lys Val Ser Ser Val Leu Tyr Ser Val Leu Ser Pro Thr Leu Asn  
210 215 220

<210> 30  
<211> 223  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 30

Cys Asn Leu Ala Thr Met Asp Ile Ile Cys Thr Ser Ser Val Leu Pro  
1 5 10 15

Lys Ala Leu Val Gly Leu Leu Ser Glu Glu Asn Thr Thr Ser Phe Lys  
20 25 30

Gly Cys Met Thr Gln Leu Phe Phe Leu Val Trp Ser Gly Ser Ser Glu  
35 40 45

Leu Leu Leu Leu Thr Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys  
50 55 60

Leu Pro Leu His Tyr Ser Ser Arg Met Ser Pro Gln Leu Cys Gly Thr  
65 70 75 80

Phe Ala Val Gly Val Trp Ser Ile Cys Ala Leu Asn Ala Ser Ile Asn  
85 90 95

Thr Gly Leu Met Thr Arg Leu Ser Phe Cys Gly Pro Lys Val Ile Thr  
100 105 110

His Phe Phe Cys Glu Ile Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ser Pro  
115 120 125

Thr Tyr Ile Asn Ser Val Met Thr Leu Val Ala Asp Ala Phe Tyr Gly  
130 135 140

Gly Ile Asn Phe Leu Leu Thr Leu Leu Ser Tyr Gly Cys Ile Ile Ala  
 145 150 155 160

Ser Ile Leu Arg Met Arg Ser Ala Glu Gly Lys Arg Lys Ala Phe Ser  
 165 170 175

Thr Cys Ser Ser His Leu Ile Val Val Ser Val Tyr Tyr Ser Ser Val  
 180 185 190

Phe Cys Ala Tyr Val Ser Pro Ala Ser Ser Tyr Ser Pro Glu Arg Ser  
 195 200 205

Lys Val Ser Ser Val Leu Tyr Ser Val Leu Ser Pro Thr Leu Asn  
 210 215 220

<210> 31  
 <211> 1661  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> AF121974  
 <309> 1999-04-25  
 <313> (1)..(1661)

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (303)..(1307)

<400> 31  
 gtntacatag tgagttcgag gccagccagg gctacacaga caaacctgt ctcgaaaaac 60  
 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaattcatt aatgaaaaag aagggggaaa atggagggcc 120  
 atggaaagta gctacttcta acatacaact cttcatttcc tccatagaaa tgctgtagtt 180  
 aatgtctaca cccagtccag cctgggtgagg ctggggcagg tcctagcagg gcctttcagg 240

gactgaaccc cggcatcctg cccctcccct ctccctggag cctccccaag ccctcaggcg	300
tc atg tca ggg tgg agc aat ggc acc tac aat gag tcc tac acc agc	347
Met Ser Gly Trp Ser Asn Gly Thr Tyr Asn Glu Ser Tyr Thr Ser	
1 5 10 15	
ttc ctc ctc atg ggc ttc cca ggg atg cag gaa gcc aga gcc ctc ctg	395
Phe Leu Leu Met Gly Phe Pro Gly Met Gln Glu Ala Arg Ala Leu Leu	
20 25 30	
gtg ctg ccc ttc ctc agc ctc tac ctg gtg atc ctc ttc acc aat gcc	443
Val Leu Pro Phe Leu Ser Leu Tyr Leu Val Ile Leu Phe Thr Asn Ala	
35 40 45	
ctg gtc atc cac acg gtg gca tcc cag cgc agc ctg cac cag ccc atg	491
Leu Val Ile His Thr Val Ala Ser Gln Arg Ser Leu His Gln Pro Met	
50 55 60	
tac ctg ctc att gcc ctg ctc ctg gct gtc aat atc tgc gct gcc acc	539
Tyr Leu Leu Ile Ala Leu Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Ala Ala Thr	
65 70 75	
acc gtg gtg ccc ccc atg ctc ttc agc ttc tcc aca cgc ttc aac cgc	587
Thr Val Val Pro Pro Met Leu Phe Ser Phe Ser Thr Arg Phe Asn Arg	
80 85 90 95	
atc tcc ctc cct cga tgc ttg gga caa atg ttc tgc atc tac ttc ctt	635
Ile Ser Leu Pro Arg Cys Leu Gly Gln Met Phe Cys Ile Tyr Phe Leu	
100 105 110	
att gtc ttt gac tgc aac atc ctc ctg gtc atg gct cta gat cgc tat	683
Ile Val Phe Asp Cys Asn Ile Leu Leu Val Met Ala Leu Asp Arg Tyr	
115 120 125	
gtg gct atc tgc tac cct ctc cgc tac cca gaa ata gtg aca gga cag	731
Val Ala Ile Cys Tyr Pro Leu Arg Tyr Pro Glu Ile Val Thr Gly Gln	
130 135 140	
tta ctg gct ggt ctg gtg gtg ctg gca gtc acc agg agc aca agc att	779
Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Val Thr Arg Ser Thr Ser Ile	
145 150 155	
gtt gct cca gtg gtg gtg ctg gcc tcg cgg gtt cgc ttc tgt cgc tca	827
Val Ala Pro Val Val Val Leu Ala Ser Arg Val Arg Phe Cys Arg Ser	
160 165 170 175	
gat gtg atc cgc cac ttt gcc tgt gag cac atg gcc ctg atg aag ctt	875
Asp Val Ile Arg His Phe Ala Cys Glu His Met Ala Leu Met Lys Leu	
180 185 190	

tcc tgt ggg gac atc tcg ctg aat aag acg gtg gga ctc act gtt cgc Ser Cys Gly Asp Ile Ser Leu Asn Lys Thr Val Gly Leu Thr Val Arg 195 200 205	923
atc ttc aac cga gtc ctg gat atg ctc ctg tta ggt gcc tcc tac tcc Ile Phe Asn Arg Val Leu Asp Met Leu Leu Leu Gly Ala Ser Tyr Ser 210 215 220	971
cgc atc atc cat gct gcc ttc agg atc tca tca ggt gga gca cgg tcc Arg Ile Ile His Ala Ala Phe Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Arg Ser 225 230 235	1019
aaa gcc ctg aac acc tgt ggc tcc cac ctg ctg gtc atc ttc acc gtc Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Leu Leu Val Ile Phe Thr Val 240 245 250 255	1067
tac tcc tcc acc atg tcc tca tcc att gtc tac cgt gtg gca cgc act Tyr Ser Ser Thr Met Ser Ser Ser Ile Val Tyr Arg Val Ala Arg Thr 260 265 270	1115
gcc tcc caa gat gtg cac aac ttg ctt agt gct ttc tat ctg ttg ctc Ala Ser Gln Asp Val His Asn Leu Leu Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Leu 275 280 285	1163
ccc tgt ctg gtc aac ccc atc atc tac ggg gcc aga acc aag gaa atc Pro Cys Leu Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Thr Lys Glu Ile 290 295 300	1211
agg cag cac ctg gta gct ctg ttc caa agg act cag caa cag gtc ttc Arg Gln His Leu Val Ala Leu Phe Gln Arg Thr Gln Gln Gln Val Phe 305 310 315	1259
act gag aag ccc cag tcc ctg ccc tcg aat aga gag ctt cct gga tga Thr Glu Lys Pro Gln Ser Leu Pro Ser Asn Arg Glu Leu Pro Gly 320 325 330	1307
ttgtccagaa tttgtgggtc tcaaaatcac tttcactatt cagtgaagga ggggcattca	1367
agtgggcatt cgtctctggt atattttgtc tcggctatitt tagttcagca tcctatttat	1427
gagaagggtc tattctatat ctccagctgt ctagaactcc ttaagtggcc caggatgacc	1487
tggaacccaa acaattctcc tttcttagtt tgccaaatgc tagcattaga ggcatgagtc	1547
acagtgcctg gcttatctgc actcatactg gagagcctca tgtctgcttt ccaaaaagca	1607
cctactcact ctgaactagc aactgaaagc aagctctaac cctggcttga agtt	1661



<211> 334  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 32

Met Ser Gly Trp Ser Asn Gly Thr Tyr Asn Glu Ser Tyr Thr Ser Phe  
 1 5 10 15

Leu Leu Met Gly Phe Pro Gly Met Gln Glu Ala Arg Ala Leu Leu Val  
 20 25 30

Leu Pro Phe Leu Ser Leu Tyr Leu Val Ile Leu Phe Thr Asn Ala Leu  
 35 40 45

Val Ile His Thr Val Ala Ser Gln Arg Ser Leu His Gln Pro Met Tyr  
 50 55 60

Leu Leu Ile Ala Leu Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Ala Ala Thr Thr  
 65 70 75 80

Val Val Pro Pro Met Leu Phe Ser Phe Ser Thr Arg Phe Asn Arg Ile  
 85 90 95

Ser Leu Pro Arg Cys Leu Gly Gln Met Phe Cys Ile Tyr Phe Leu Ile  
 100 105 110

Val Phe Asp Cys Asn Ile Leu Leu Val Met Ala Leu Asp Arg Tyr Val  
 115 120 125

Ala Ile Cys Tyr Pro Leu Arg Tyr Pro Glu Ile Val Thr Gly Gln Leu  
 130 135 140

Leu Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Val Thr Arg Ser Thr Ser Ile Val  
 145 150 155 160

Ala Pro Val Val Val Leu Ala Ser Arg Val Arg Phe Cys Arg Ser Asp  
 165 170 175

Val Ile Arg His Phe Ala Cys Glu His Met Ala Leu Met Lys Leu Ser  
                   180                                  185                                  190

Cys Gly Asp Ile Ser Leu Asn Lys Thr Val Gly Leu Thr Val Arg Ile  
                   195                                  200                                  205

Phe Asn Arg Val Leu Asp Met Leu Leu Leu Gly Ala Ser Tyr Ser Arg  
                   210                                  215                                  220

Ile Ile His Ala Ala Phe Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Arg Ser Lys  
                   225                                  230                                  235                                  240

Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Leu Leu Val Ile Phe Thr Val Tyr  
                                   245                                  250                                  255

Ser Ser Thr Met Ser Ser Ser Ile Val Tyr Arg Val Ala Arg Thr Ala  
                                   260                                  265                                  270

Ser Gln Asp Val His Asn Leu Leu Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Leu Pro  
                   275                                  280                                  285

Cys Leu Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Thr Lys Glu Ile Arg  
                   290                                  295                                  300

Gln His Leu Val Ala Leu Phe Gln Arg Thr Gln Gln Gln Val Phe Thr  
                   305                                  310                                  315                                  320

Glu Lys Pro Gln Ser Leu Pro Ser Asn Arg Glu Leu Pro Gly  
                                   325                                  330

<210> 33  
 <211> 1116  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> AF121975  
 <309> 1999-04-25  
 <313> (1)..(1116)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (15)..(15)

&lt;223&gt; n is a, c, g, or t

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (50)..(1015)

&lt;400&gt; 33

caagctggct cttctactg tctctccatt agtttttagtc gtcacggga atg aat tca 58  
 Met Asn Ser  
 1

aaa gca agc atg ctt gga act aac ttc act atc atc cat cca act gtg 106  
 Lys Ala Ser Met Leu Gly Thr Asn Phe Thr Ile Ile His Pro Thr Val  
 5 10 15

ttc atc ctg ctt gga atc cca ggg ctg gag cag tac cac acc tgg ctt 154  
 Phe Ile Leu Leu Gly Ile Pro Gly Leu Glu Gln Tyr His Thr Trp Leu  
 20 25 30 35

tct att cct ttt tgt ctt atg tac att gct gca gtc ttg ggg aac gga 202  
 Ser Ile Pro Phe Cys Leu Met Tyr Ile Ala Ala Val Leu Gly Asn Gly  
 40 45 50

gcc ctc atc ctt gtt gtc ctg agt gaa cgc acc ctc cat gag ccc atg 250  
 Ala Leu Ile Leu Val Val Leu Ser Glu Arg Thr Leu His Glu Pro Met  
 55 60 65

tat gtc ttt ctg tcc atg ctg gct ggc act gat att ctc ctg tca acc 298  
 Tyr Val Phe Leu Ser Met Leu Ala Gly Thr Asp Ile Leu Leu Ser Thr  
 70 75 80

acc act gtg cct aag acc ttg gct atc ttt tgg ttc cat gct ggg gag 346  
 Thr Thr Val Pro Lys Thr Leu Ala Ile Phe Trp Phe His Ala Gly Glu  
 85 90 95

atc ccc ttt gat gcc tgc att gct cag atg ttt ttc atc cac gtt gct 394  
 Ile Pro Phe Asp Ala Cys Ile Ala Gln Met Phe Phe Ile His Val Ala  
 100 105 110 115

ttt gtg gct gag tcg gga atc ctt ctg gcc atg gca ttt gac cga tat 442  
 Phe Val Ala Glu Ser Gly Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr  
 120 125 130

gtg gct att tgt act cct ctg aga tac tca gcc gtc tta aca cct atg 490  
 Val Ala Ile Cys Thr Pro Leu Arg Tyr Ser Ala Val Leu Thr Pro Met  
 135 140 145

gca att gga aaa atg acc ctg gcc atc tgg gga cgg agc att ggg aca Ala Ile Gly Lys Met Thr Leu Ala Ile Trp Gly Arg Ser Ile Gly Thr 150 155 160	538
att ttc cct atc ata ttt ctg ctg aag agg ctg tca tac tgc agg acc Ile Phe Pro Ile Ile Phe Leu Leu Lys Arg Leu Ser Tyr Cys Arg Thr 165 170 175	586
aat gtc atc cca cac tca tat tgt gag cat att ggt gta gcc aga ttg Asn Val Ile Pro His Ser Tyr Cys Glu His Ile Gly Val Ala Arg Leu 180 185 190 195	634
gct tgt gct gac atc act gtc aat atc tgg tat ggc ttc tcg gtg cca Ala Cys Ala Asp Ile Thr Val Asn Ile Trp Tyr Gly Phe Ser Val Pro 200 205 210	682
atg gct tca gtt ttg gta gat gtt gca ctc att ggt att tct tat acg Met Ala Ser Val Leu Val Asp Val Ala Leu Ile Gly Ile Ser Tyr Thr 215 220 225	730
ttg atc ctc cag gct gtg ttt aga ctt cct tcc cag gat gct agg cac Leu Ile Leu Gln Ala Val Phe Arg Leu Pro Ser Gln Asp Ala Arg His 230 235 240	778
aag gcc ctc aat acc tgt ggt tct cac att ggg gtc att ctc ctc ttt Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Ile Gly Val Ile Leu Leu Phe 245 250 255	826
ttc ata cca tca ttt ttt act ttc ctt act cat cgc ttt ggc aag aac Phe Ile Pro Ser Phe Phe Thr Phe Leu Thr His Arg Phe Gly Lys Asn 260 265 270 275	874
atc ccc cac cat gtg cac att ctt ctg gca aat ctc tat gtg ttg gtt Ile Pro His His Val His Ile Leu Leu Ala Asn Leu Tyr Val Leu Val 280 285 290	922
ccc ccc atg ctt aac cct atc atc tat ggt gct aag acc aag caa att Pro Pro Met Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Lys Thr Lys Gln Ile 295 300 305	970
agg gac agc atg act cgc atg ttg tct gtt gtg tgg aag tct tga Arg Asp Ser Met Thr Arg Met Leu Ser Val Val Trp Lys Ser 310 315 320	1015
gagcagtcac agttcacaaa gctgtcttag tttctcttac aaacaggaga gagagagaga	1075
gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga g	1116

<210> 34  
 <211> 321  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 34

Met Asn Ser Lys Ala Ser Met Leu Gly Thr Asn Phe Thr Ile Ile His  
 1 5 10 15

Pro Thr Val Phe Ile Leu Leu Gly Ile Pro Gly Leu Glu Gln Tyr His  
 20 25 30

Thr Trp Leu Ser Ile Pro Phe Cys Leu Met Tyr Ile Ala Ala Val Leu  
 35 40 45

Gly Asn Gly Ala Leu Ile Leu Val Val Leu Ser Glu Arg Thr Leu His  
 50 55 60

Glu Pro Met Tyr Val Phe Leu Ser Met Leu Ala Gly Thr Asp Ile Leu  
 65 70 75 80

Leu Ser Thr Thr Thr Val Pro Lys Thr Leu Ala Ile Phe Trp Phe His  
 85 90 95

Ala Gly Glu Ile Pro Phe Asp Ala Cys Ile Ala Gln Met Phe Phe Ile  
 100 105 110

His Val Ala Phe Val Ala Glu Ser Gly Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe  
 115 120 125

Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Thr Pro Leu Arg Tyr Ser Ala Val Leu  
 130 135 140

Thr Pro Met Ala Ile Gly Lys Met Thr Leu Ala Ile Trp Gly Arg Ser  
 145 150 155 160

Ile Gly Thr Ile Phe Pro Ile Ile Phe Leu Leu Lys Arg Leu Ser Tyr  
 165 170 175

Cys Arg Thr Asn Val Ile Pro His Ser Tyr Cys Glu His Ile Gly Val  
 180 185 190

Ala Arg Leu Ala Cys Ala Asp Ile Thr Val Asn Ile Trp Tyr Gly Phe  
 195 200 205

Ser Val Pro Met Ala Ser Val Leu Val Asp Val Ala Leu Ile Gly Ile  
 210 215 220

Ser Tyr Thr Leu Ile Leu Gln Ala Val Phe Arg Leu Pro Ser Gln Asp  
 225 230 235 240

Ala Arg His Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Ile Gly Val Ile  
 245 250 255

Leu Leu Phe Phe Ile Pro Ser Phe Phe Thr Phe Leu Thr His Arg Phe  
 260 265 270

Gly Lys Asn Ile Pro His His Val His Ile Leu Leu Ala Asn Leu Tyr  
 275 280 285

Val Leu Val Pro Pro Met Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Lys Thr  
 290 295 300

Lys Gln Ile Arg Asp Ser Met Thr Arg Met Leu Ser Val Val Trp Lys  
 305 310 315 320

Ser

<210> 35  
 <211> 1267  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> AF121977  
 <309> 1999-04-25  
 <313> (1)..(1267)

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (108)..(108)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> CDS
<222> (172)..(1200)

<400> 35
tctattgctc actgaaatat aaactagcaa catgaagaac atatgattga actatatcaa      60
agaacaaat ttttctaata ataatgacc atgaatcatt gaatttcnta agctgaagtt      120
ctttcatgag gtaccacaca acagcatggt cctgtacaca tgtaactacc t atg ttt      177
                                         Met Phe
                                         1

tgt cat tta tat aat gag aac aat atg caa gtg gca atc ctg gat tcc      225
Cys His Leu Tyr Asn Glu Asn Asn Met Gln Val Ala Ile Leu Asp Ser
          5                      10                      15

att cta ata cct tct tat ttt tct ttc ctg aca gag atg gag cct gga      273
Ile Leu Ile Pro Ser Tyr Phe Ser Phe Leu Thr Glu Met Glu Pro Gly
      20                      25                      30

aac tac aca gtt gta aca gaa ttc att ctt tta ggg tta aca gat gat      321
Asn Tyr Thr Val Val Thr Glu Phe Ile Leu Leu Gly Leu Thr Asp Asp
35                      40                      45                      50

att aca gtc agt gtc att tta ttt gtt atg ttt cta atc gtc tat tct      369
Ile Thr Val Ser Val Ile Leu Phe Val Met Phe Leu Ile Val Tyr Ser
          55                      60                      65

gtt act tta atg ggt aac ttg aac ata att gtg cta atc aga acc agc      417
Val Thr Leu Met Gly Asn Leu Asn Ile Ile Val Leu Ile Arg Thr Ser
          70                      75                      80

cct cag ctt cac acc ccc atg tac ctt ttc ctt agc cat ttg gcc ttt      465
Pro Gln Leu His Thr Pro Met Tyr Leu Phe Leu Ser His Leu Ala Phe
          85                      90                      95

cta gac att ggg tac tcc agc tca gtt aca ccc atc atg ctg agg ggc      513
Leu Asp Ile Gly Tyr Ser Ser Ser Val Thr Pro Ile Met Leu Arg Gly
          100                      105                      110

ttt ctc aga aag gga aca ttt atc cct gtg gct ggc tgt gtg gct caa      561
Phe Leu Arg Lys Gly Thr Phe Ile Pro Val Ala Gly Cys Val Ala Gln

```

115	120	125	130	
ctc tgt att gtg gtg gca ttt ggg aca tct gaa tct ttc ttg cta gct Leu Cys Ile Val Val Ala Phe Gly Thr Ser Glu Ser Phe Leu Leu Ala	135	140	145	609
tcc atg gcc tat gac cgc tat gtg gcc atc tgc tca cct ttg ctc tac Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Ser Pro Leu Leu Tyr	150	155	160	657
tca aca cag atg tcc tcc aca gtc tgc atc ctc cta gtt gga act tcc Ser Thr Gln Met Ser Ser Thr Val Cys Ile Leu Leu Val Gly Thr Ser	165	170	175	705
tac cta ggt gga tgg gtg aat gct tgg ata ttt act ggt tgc tcc tta Tyr Leu Gly Gly Trp Val Asn Ala Trp Ile Phe Thr Gly Cys Ser Leu	180	185	190	753
aat ctg tca ttt tgt ggg cca aat aaa att aat cac ttt ttc tgt gac Asn Leu Ser Phe Cys Gly Pro Asn Lys Ile Asn His Phe Phe Cys Asp	195	200	205	801
tat tca cca cta ttg aag ctt tct tgt tct cat gac ttt tct ttt gaa Tyr Ser Pro Leu Leu Lys Leu Ser Cys Ser His Asp Phe Ser Phe Glu	215	220	225	849
gtc att cca gca atc tct tcg gga tcc atc att gtg gtc act gtg ttt Val Ile Pro Ala Ile Ser Ser Gly Ser Ile Ile Val Val Thr Val Phe	230	235	240	897
atc att gct ctg tct tat gtc tac atc ctt gtg tca atc ctg aag atg Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Val Tyr Ile Leu Val Ser Ile Leu Lys Met	245	250	255	945
cgc tct act gaa ggt cgc cag aag gcc ttc tcc acc tgc act tcc cac Arg Ser Thr Glu Gly Arg Gln Lys Ala Phe Ser Thr Cys Thr Ser His	260	265	270	993
ctc act gca gtc act ctg ttc ttt ggg acc atc aca ttc att tat gtg Leu Thr Ala Val Thr Leu Phe Phe Gly Thr Ile Thr Phe Ile Tyr Val	275	280	285	1041
atg ccc cag tcc agc tac tcc aca gac cag aac aaa gtg gtg tct gtg Met Pro Gln Ser Ser Tyr Ser Thr Asp Gln Asn Lys Val Val Ser Val	295	300	305	1089
ttt tac aca gtg gtg atc ccc atg ttg aat ccc ctc atc tac agt ttc Phe Tyr Thr Val Val Ile Pro Met Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ser Phe	310	315	320	1137



aga aac aaa gag gtt aaa gaa gcc atg aaa aaa ctg att gct aaa aca 1185  
 Arg Asn Lys Glu Val Lys Glu Ala Met Lys Lys Leu Ile Ala Lys Thr  
           325                                  330                                  335

cat tgg tgg tcc tga aatatttgaa ttacaaaca gtaaattctg ctcttacagg 1240  
 His Trp Trp Ser  
           340

taaatggcag tatactaagt aaattac 1267

<210> 36

<211> 342

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Met Phe Cys His Leu Tyr Asn Glu Asn Asn Met Gln Val Ala Ile Leu  
 1                          5                                  10                                  15

Asp Ser Ile Leu Ile Pro Ser Tyr Phe Ser Phe Leu Thr Glu Met Glu  
           20                                  25                                  30

Pro Gly Asn Tyr Thr Val Val Thr Glu Phe Ile Leu Leu Gly Leu Thr  
           35                                  40                                  45

Asp Asp Ile Thr Val Ser Val Ile Leu Phe Val Met Phe Leu Ile Val  
           50                                  55                                  60

Tyr Ser Val Thr Leu Met Gly Asn Leu Asn Ile Ile Val Leu Ile Arg  
 65                          70                                  75                                  80

Thr Ser Pro Gln Leu His Thr Pro Met Tyr Leu Phe Leu Ser His Leu  
           85                                  90                                  95

Ala Phe Leu Asp Ile Gly Tyr Ser Ser Ser Val Thr Pro Ile Met Leu  
           100                                  105                                  110

Arg Gly Phe Leu Arg Lys Gly Thr Phe Ile Pro Val Ala Gly Cys Val  
           115                                  120                                  125

Ala Gln Leu Cys Ile Val Val Ala Phe Gly Thr Ser Glu Ser Phe Leu  
130 135 140

Leu Ala Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Ser Pro Leu  
145 150 155 160

Leu Tyr Ser Thr Gln Met Ser Ser Thr Val Cys Ile Leu Leu Val Gly  
165 170 175

Thr Ser Tyr Leu Gly Gly Trp Val Asn Ala Trp Ile Phe Thr Gly Cys  
180 185 190

Ser Leu Asn Leu Ser Phe Cys Gly Pro Asn Lys Ile Asn His Phe Phe  
195 200 205

Cys Asp Tyr Ser Pro Leu Leu Lys Leu Ser Cys Ser His Asp Phe Ser  
210 215 220

Phe Glu Val Ile Pro Ala Ile Ser Ser Gly Ser Ile Ile Val Val Thr  
225 230 235 240

Val Phe Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Val Tyr Ile Leu Val Ser Ile Leu  
245 250 255

Lys Met Arg Ser Thr Glu Gly Arg Gln Lys Ala Phe Ser Thr Cys Thr  
260 265 270

Ser His Leu Thr Ala Val Thr Leu Phe Phe Gly Thr Ile Thr Phe Ile  
275 280 285

Tyr Val Met Pro Gln Ser Ser Tyr Ser Thr Asp Gln Asn Lys Val Val  
290 295 300

Ser Val Phe Tyr Thr Val Val Ile Pro Met Leu Asn Pro Leu Ile Tyr  
305 310 315 320

Ser Phe Arg Asn Lys Glu Val Lys Glu Ala Met Lys Lys Leu Ile Ala  
325 330 335

Lys Thr His Trp Trp Ser  
340

<210> 37  
<211> 1120  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<300>  
<308> AF121979  
<309> 1999-04-25  
<313> (1)..(1120)

<220>  
<221> CDS  
<222> (84)..(1040)

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (940)..(940)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1083)..(1083)  
<223> n is a, c, g, or t

<400> 37  
tgtcattatt agtgctgata aagtgtgtgc aagtcctgtg agattccttc aaatgaatat 60  
  
gtccatcaga ggctcctgac aac atg tca cca ggc aac agc tca tgg att cat 113  
Met Ser Pro Gly Asn Ser Ser Trp Ile His  
1 5 10  
  
cct tct tcc ttc ctg ctc ttg gga atc cca gga ctg gaa gag ttg cag 161  
Pro Ser Ser Phe Leu Leu Leu Gly Ile Pro Gly Leu Glu Glu Leu Gln  
15 20 25  
  
ttc tgg ctt ggt ttg cca ttt gga aca gtc tat ctt att gct gtc cta 209  
Phe Trp Leu Gly Leu Pro Phe Gly Thr Val Tyr Leu Ile Ala Val Leu  
30 35 40  
  
ggg aat gtc atc att ctc ttt gta atc tat cta gag cac agc ctt cac 257  
Gly Asn Val Ile Ile Leu Phe Val Ile Tyr Leu Glu His Ser Leu His  
45 50 55

caa cct atg ttc tac tta ctg gcc ata ctg gct gtt act gac ttg ggt Gln Pro Met Phe Tyr Leu Leu Ala Ile Leu Ala Val Thr Asp Leu Gly 60 65 70	305
ctg tct aca gca act gtt ccc aga gca ctc ggt ata ttc tgg ttt ggc Leu Ser Thr Ala Thr Val Pro Arg Ala Leu Gly Ile Phe Trp Phe Gly 75 80 85 90	353
ttc cat aag att gcc ttt agg gac tgt gta gct caa atg ttt ttc ata Phe His Lys Ile Ala Phe Arg Asp Cys Val Ala Gln Met Phe Phe Ile 95 100 105	401
cat ctg ttt aca ggc atc gaa aca ttc atg ctt gta gct atg gcc ttt His Leu Phe Thr Gly Ile Glu Thr Phe Met Leu Val Ala Met Ala Phe 110 115 120	449
gat cgc tac att gcc atc tgt aac cct ctc cga tat aac act atc ctc Asp Arg Tyr Ile Ala Ile Cys Asn Pro Leu Arg Tyr Asn Thr Ile Leu 125 130 135	497
acc aac aga aca atc tgc att att gtt gga gtt gga cta ttt aaa aat Thr Asn Arg Thr Ile Cys Ile Ile Val Gly Val Gly Leu Phe Lys Asn 140 145 150	545
ttc att ttg gtt ttt cca ctt ata ttt ctc att cta agg ctt tca ttc Phe Ile Leu Val Phe Pro Leu Ile Phe Leu Ile Leu Arg Leu Ser Phe 155 160 165 170	593
tgt gga cac aat atc ata cca cac aca tac tgt gag cac atg ggc att Cys Gly His Asn Ile Ile Pro His Thr Tyr Cys Glu His Met Gly Ile 175 180 185	641
gct cga ctg gca tgc gtc agc atc aag gtt aat gta tta ttt gga tta Ala Arg Leu Ala Cys Val Ser Ile Lys Val Asn Val Leu Phe Gly Leu 190 195 200	689
ata ctc ata tct atg ata ctt ctg gat gtt gtt ttg agt gct ctg tcc Ile Leu Ile Ser Met Ile Leu Leu Asp Val Val Leu Ser Ala Leu Ser 205 210 215	737
tat gcg aaa att ctt cat gct gta ttt aaa ctc cca tcc tgg gaa gcc Tyr Ala Lys Ile Leu His Ala Val Phe Lys Leu Pro Ser Trp Glu Ala 220 225 230	785
aga ctc aaa gct ctt aat acc tgt ggt tcc cat gtg tgt gtg atc ttg Arg Leu Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Val Cys Val Ile Leu 235 240 245 250	833
gct ttc ttc act cca gcc ttt ttc tcc ttc ttg act cat cga ttt gga Ala Phe Phe Thr Pro Ala Phe Phe Ser Phe Leu Thr His Arg Phe Gly 881	



65

70

75

80

Pro Arg Ala Leu Gly Ile Phe Trp Phe Gly Phe His Lys Ile Ala Phe  
                                     85                                    90                                    95

Arg Asp Cys Val Ala Gln Met Phe Phe Ile His Leu Phe Thr Gly Ile  
                                     100                                    105                                    110

Glu Thr Phe Met Leu Val Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Ile Ala Ile  
                                     115                                    120                                    125

Cys Asn Pro Leu Arg Tyr Asn Thr Ile Leu Thr Asn Arg Thr Ile Cys  
                                     130                                    135                                    140

Ile Ile Val Gly Val Gly Leu Phe Lys Asn Phe Ile Leu Val Phe Pro  
                                     145                                    150                                    155                                    160

Leu Ile Phe Leu Ile Leu Arg Leu Ser Phe Cys Gly His Asn Ile Ile  
                                     165                                    170                                    175

Pro His Thr Tyr Cys Glu His Met Gly Ile Ala Arg Leu Ala Cys Val  
                                     180                                    185                                    190

Ser Ile Lys Val Asn Val Leu Phe Gly Leu Ile Leu Ile Ser Met Ile  
                                     195                                    200                                    205

Leu Leu Asp Val Val Leu Ser Ala Leu Ser Tyr Ala Lys Ile Leu His  
                                     210                                    215                                    220

Ala Val Phe Lys Leu Pro Ser Trp Glu Ala Arg Leu Lys Ala Leu Asn  
                                     225                                    230                                    235                                    240

Thr Cys Gly Ser His Val Cys Val Ile Leu Ala Phe Phe Thr Pro Ala  
                                     245                                    250                                    255

Phe Phe Ser Phe Leu Thr His Arg Phe Gly His Asn Ile Pro Arg Tyr  
                                     260                                    265                                    270

Ile His Ile Leu Leu Ala Asn Leu Tyr Val Ile Ile Pro Xaa Ala Leu  
 275 280 285

Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Val Arg Thr Lys Gln Ile Gln Asp Arg Ala  
 290 295 300

Val Thr Ile Leu Cys Asn Glu Val Gly Gln Leu Ala Asp Asp  
 305 310 315

<210> 39  
 <211> 2333  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> M36778  
 <309> 1995-08-22  
 <313> (1)..(2333)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (24)..(1088)

<400> 39  
 gctgtggcag ggaaggggcc acc atg gga tgt acg ctg agc gca gag gag aga 53  
 Met Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu Arg  
 1 5 10

gcc gcc ctc gag cgg agc aag gcg att gag aaa aac ctc aaa gaa gat 101  
 Ala Ala Leu Glu Arg Ser Lys Ala Ile Glu Lys Asn Leu Lys Glu Asp  
 15 20 25

ggc atc agc gcc gcc aaa gac gtg aaa tta ctc ctg ctg ggg gct gga 149  
 Gly Ile Ser Ala Ala Lys Asp Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly  
 30 35 40

gaa tca gga aaa agc acc att gtg aag cag atg aag atc atc cat gaa 197  
 Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu  
 45 50 55

gat ggc ttc tct ggg gaa gac gtg aag cag tac aag cct gtg gtc tac 245  
 Asp Gly Phe Ser Gly Glu Asp Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr  
 60 65 70

agc aac acc atc cag tct ctg gcg gcc att gtc cgg gcc atg gac act 293  
 Ser Asn Thr Ile Gln Ser Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Met Asp Thr

75	80	85	90	
ttg ggc gtg gag tat ggt gac aag gag agg aag acg gac tcc aag atg				341
Leu Gly Val Glu Tyr Gly Asp Lys Glu Arg Lys Thr Asp Ser Lys Met	95	100	105	
gtg tgt gac gtg gtg agt cgt atg gaa gac act gaa ccg ttc tct gca				389
Val Cys Asp Val Val Ser Arg Met Glu Asp Thr Glu Pro Phe Ser Ala	110	115	120	
gaa ctt ctt tct gcc atg atg cga ctc tgg ggc gac tcg ggg atc cag				437
Glu Leu Leu Ser Ala Met Met Arg Leu Trp Gly Asp Ser Gly Ile Gln	125	130	135	
gag tgc ttc aac cga tct cgg gag tat cag ctc aat gac tct gcc aaa				485
Glu Cys Phe Asn Arg Ser Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Lys	140	145	150	
tac tac ctg gac agc ctg gat cgg att gga gcc ggt gac tac cag ccc				533
Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu Asp Arg Ile Gly Ala Gly Asp Tyr Gln Pro	155	160	165	170
act gag cag gac atc ctc cga acc aga gtc aaa aca act ggc atc gta				581
Thr Glu Gln Asp Ile Leu Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val	175	180	185	
gaa acc cac ttc acc ttc aag aac ctc cac ttc agg ctg ttt gac gtc				629
Glu Thr His Phe Thr Phe Lys Asn Leu His Phe Arg Leu Phe Asp Val	190	195	200	
ggg ggc cag cga tct gaa cgc aag aag tgg atc cac tgc ttt gag gat				677
Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asp	205	210	215	
gtc acg gcc atc atc ttc tgt gtc gca ctc agc ggc tat gac cag gtg				725
Val Thr Ala Ile Ile Phe Cys Val Ala Leu Ser Gly Tyr Asp Gln Val	220	225	230	
ctc cac gag gac gaa acc acg aac cgc atg cac gaa tcc ctg aag ctc				773
Leu His Glu Asp Glu Thr Thr Asn Arg Met His Glu Ser Leu Lys Leu	235	240	245	250
ttc gac agc atc tgc aac aac aag tgg ttc aca gac aca tct att atc				821
Phe Asp Ser Ile Cys Asn Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile	255	260	265	
ctg ttt ctc aac aag aag gac ata ttt gag gag aag atc aag aag tcc				869
Leu Phe Leu Asn Lys Lys Asp Ile Phe Glu Glu Lys Ile Lys Lys Ser	270	275	280	



cca ctc acc atc tgc ttt cct gaa tac aca ggc ccc agt gcc ttc aca	917
Pro Leu Thr Ile Cys Phe Pro Glu Tyr Thr Gly Pro Ser Ala Phe Thr	
285 290 295	
gaa gct gtg gct cac atc caa ggg cag tat gag agt aag aat aag tca	965
Glu Ala Val Ala His Ile Gln Gly Gln Tyr Glu Ser Lys Asn Lys Ser	
300 305 310	
gct cac aag gaa gtc tac agc cat gtc acc tgt gcc acg gac acc aac	1013
Ala His Lys Glu Val Tyr Ser His Val Thr Cys Ala Thr Asp Thr Asn	
315 320 325 330	
aac atc caa ttc gtc ttt gat gcc gtg aca gat gtc atc atc gcc aaa	1061
Asn Ile Gln Phe Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Ala Lys	
335 340 345	
aac cta cgg ggc tgt gga ctc tac tga gccctggcct cctaccagc	1108
Asn Leu Arg Gly Cys Gly Leu Tyr	
350	
ctgccactca ctctcccct ggaccagag ctctgtcact gtcagatgc cctgttaact	1168
gaagaaaacc tggaggctag ccttgggggc aggaggaggc atcctttgag catccccacc	1228
ccaccaact tcagcctcgt gacacgtggg aacagggttg ggcagaggtg tggaacagca	1288
caaggccaga gaccacggca tgccacttgg gtgctgctca ctggtcagct gtgtgtctta	1348
cacagaggcc gagtgggcaa cactgccatc tgattcagaa tgggcatgcc ctgtcctctg	1408
tacctcttgt tcagtgtcct ggtttctctt ccaccttggt gataggatgg ctggcaggaa	1468
ggcccatgg aaggtgctgc ttgattaggg gatagtcgat ggcatctctc agcagtcctc	1528
agggtctgtt tggtagaggg tggtttcgtc gacaaaagcc aacatggaat caggccactt	1588
ttggggcgca aagactcaga ctttggggac gggttccctc ctcttcact ttggatcttg	1648
gccctctctt ggtcatcttc ccttgccctt gggctcccca ggatactcag ccctgactcc	1708
catggggttg ggaatattcc ttaagactgg ctgactgcaa aggtcaccga tggagaaaca	1768
tccctgtgct acagaattgg ggggtgggaca gctgaggggg caggcggctc tttcctgata	1828
gttgatgaca agccctgaga atgccatctg ctggctccac tcacacgggc tcaactgtcc	1888
tgggtgatag tgacttgcca ggccacaggc tgcaggtcac agacagagca ggcaagcagc	1948
cttgcaactg cagattactt agggagaagc atcggggcct cgtgagccag gccccgtagc	2008

cagtgcctg ctttactcca gccttgggtca ggaagtcgaa agcccttgggt gtattcctgg 2068  
 tctcggagca aataatgagc cagcaccctg aagggtgggc tccaactcag acatgcagcc 2128  
 agccccctag gtgggtaaac gccctaggga cctagggaga gcctttgctg cagagattcc 2188  
 taagcaaaac ggcgtgggtgg agctttggca accctagccc cagctaactt tggacagtca 2248  
 gcatatgtcc ctgccatccc tagacatctc cagtcagctg gtatcacagc cagtgggtca 2308  
 gacaggtttg aatgctcatg tggca 2333

<210> 40

<211> 354

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Met Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu Arg Ala Ala Leu Glu Arg Ser  
 1 5 10 15

Lys Ala Ile Glu Lys Asn Leu Lys Glu Asp Gly Ile Ser Ala Ala Lys  
 20 25 30

Asp Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr  
 35 40 45

Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Phe Ser Gly Glu  
 50 55 60

Asp Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser  
 65 70 75 80

Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Met Asp Thr Leu Gly Val Glu Tyr Gly  
 85 90 95

Asp Lys Glu Arg Lys Thr Asp Ser Lys Met Val Cys Asp Val Val Ser  
 100 105 110

Arg Met Glu Asp Thr Glu Pro Phe Ser Ala Glu Leu Leu Ser Ala Met  
 115 120 125

Met Arg Leu Trp Gly Asp Ser Gly Ile Gln Glu Cys Phe Asn Arg Ser  
130 135 140

Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu  
145 150 155 160

Asp Arg Ile Gly Ala Gly Asp Tyr Gln Pro Thr Glu Gln Asp Ile Leu  
165 170 175

Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe  
180 185 190

Lys Asn Leu His Phe Arg Leu Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu  
195 200 205

Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asp Val Thr Ala Ile Ile Phe  
210 215 220

Cys Val Ala Leu Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu His Glu Asp Glu Thr  
225 230 235 240

Thr Asn Arg Met His Glu Ser Leu Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn  
245 250 255

Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys  
260 265 270

Asp Ile Phe Glu Glu Lys Ile Lys Lys Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe  
275 280 285

Pro Glu Tyr Thr Gly Pro Ser Ala Phe Thr Glu Ala Val Ala His Ile  
290 295 300

Gln Gly Gln Tyr Glu Ser Lys Asn Lys Ser Ala His Lys Glu Val Tyr  
305 310 315 320

出証特 2 0 0 4 - 3 0 6 7 5 8 1

70	75	80	85	
acg aca aat aag atg cac gcc atc cct ctg agg tcc tcc tgg gtg atg				343
Thr Thr Asn Lys Met His Ala Ile Pro Leu Arg Ser Ser Trp Val Met				
	90	95	100	
acc tgt gcc tac gcc ccg tcc ggg aac tac gtt gcc tgt gga ggc ttg				391
Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val Ala Cys Gly Gly Leu				
	105	110	115	
gat aac atc tgc tcc ata tac aac cta aag acc cga gag gga gat gtg				439
Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr Arg Glu Gly Asp Val				
	120	125	130	
cgg gtg agc cga gaa ttg gca gga cac acg ggc tac ttg tcc tgc tgc				487
Arg Val Ser Arg Glu Leu Ala Gly His Thr Gly Tyr Leu Ser Cys Cys				
	135	140	145	
cga ttc tta gat gat gga caa atc att aca agt tcg gga gac acg act				535
Arg Phe Leu Asp Asp Gly Gln Ile Ile Thr Ser Ser Gly Asp Thr Thr				
	150	155	160	165
tgt gct ttg tgg gac att gag acc gga cag cag act acg acc ttc aca				583
Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln Thr Thr Thr Phe Thr				
	170	175	180	
gga cac tcg ggt gac gtg atg agc ctc tca ctg agt cct gac ttg aag				631
Gly His Ser Gly Asp Val Met Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Leu Lys				
	185	190	195	
acg ttt gtg tct ggt gct tgt gat gca tcc tca aag ctg tgg gat atc				679
Thr Phe Val Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ser Lys Leu Trp Asp Ile				
	200	205	210	
cga gat ggg atg tgt aga cag tct ttc acc gga cac atc tca gac atc				727
Arg Asp Gly Met Cys Arg Gln Ser Phe Thr Gly His Ile Ser Asp Ile				
	215	220	225	
aac gct gtc agt ttc ttc ccg agt gga tat gcc ttt gcc act ggt tct				775
Asn Ala Val Ser Phe Phe Pro Ser Gly Tyr Ala Phe Ala Thr Gly Ser				
	230	235	240	245
gat gat gcc aca tgc cga ctc ttt gac ctc cgt gca gac cag gag ctc				823
Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg Ala Asp Gln Glu Leu				
	250	255	260	
ctg cta tac tct cat gac aat atc atc tgt ggc att act tct gtg gcc				871
Leu Leu Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly Ile Thr Ser Val Ala				
	265	270	275	

ttc tca aag agt ggg cgc ctc ctg tta gcc ggc tat gac gac ttc aac 919  
 Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly Tyr Asp Asp Phe Asn  
 280 285 290

tgc agt gtg tgg gac gct ctg aaa gga ggc cgg tca ggt gtc ctt gct 967  
 Cys Ser Val Trp Asp Ala Leu Lys Gly Gly Arg Ser Gly Val Leu Ala  
 295 300 305

ggt cat gac aac cgt gtt agc tgc tta ggt gtg act gat gac ggc atg 1015  
 Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val Thr Asp Asp Gly Met  
 310 315 320 325

gct gtg gcc act ggc tcc tgg gac agt ttt ctt aga atc tgg aat tga 1063  
 Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu Arg Ile Trp Asn  
 330 335 340

gtgccatatt ttctgttctc caatgatacc tggagaaatc cgtgttacag cctatagctg 1123

tgaggaaaaa aa 1135

<210> 42

<211> 340

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Met Ser Glu Leu Glu Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Arg Asn  
 1 5 10 15

Gln Ile Gln Asp Ala Arg Lys Ala Cys Asn Asp Ala Thr Leu Val Gln  
 20 25 30

Ile Thr Ser Asn Met Asp Ser Val Gly Arg Ile Gln Met Arg Thr Arg  
 35 40 45

Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Gly  
 50 55 60

Tyr Asp Ser Arg Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile  
 65 70 75 80

Ile Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Met His Ala Ile Pro Leu Arg  
 85 90 95

Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val  
100 105 110

Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr  
115 120 125

Arg Glu Gly Asp Val Arg Val Ser Arg Glu Leu Ala Gly His Thr Gly  
130 135 140

Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Gly Gln Ile Ile Thr Ser  
145 150 155 160

Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln  
165 170 175

Thr Thr Thr Phe Thr Gly His Ser Gly Asp Val Met Ser Leu Ser Leu  
180 185 190

Ser Pro Asp Leu Lys Thr Phe Val Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ser  
195 200 205

Lys Leu Trp Asp Ile Arg Asp Gly Met Cys Arg Gln Ser Phe Thr Gly  
210 215 220

His Ile Ser Asp Ile Asn Ala Val Ser Phe Phe Pro Ser Gly Tyr Ala  
225 230 235 240

Phe Ala Thr Gly Ser Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg  
245 250 255

Ala Asp Gln Glu Leu Leu Leu Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly  
260 265 270

Ile Thr Ser Val Ala Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly  
275 280 285

Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Ser Val Trp Asp Ala Leu Lys Gly Gly Arg  
 290 295 300

Ser Gly Val Leu Ala Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val  
 305 310 315 320

Thr Asp Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu  
 325 330 335

Arg Ile Trp Asn  
 340

<210> 43  
 <211> 307  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> U37527  
 <309> 1997-12-30  
 <313> (1)..(307)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (40)..(267)

<400> 43  
 tccaagctgc tgtaccacct ctcagcaggg agtgcagga atg aag gaa ggc atg 54  
 Met Lys Glu Gly Met  
 1 5

tct aat aac agc acc acc agc atc tcc cag gcc agg aaa gcc gtg gag 102  
 Ser Asn Asn Ser Thr Thr Ser Ile Ser Gln Ala Arg Lys Ala Val Glu  
 10 15 20

cag ctg aag atg gaa gcc tgc atg gac agg gtg aag gtc tcc cag gct 150  
 Gln Leu Lys Met Glu Ala Cys Met Asp Arg Val Lys Val Ser Gln Ala  
 25 30 35

gcc tca gac ctc ctg gcc tac tgt gaa gcc cac gtg cgg gag gac ccc 198  
 Ala Ser Asp Leu Leu Ala Tyr Cys Glu Ala His Val Arg Glu Asp Pro  
 40 45 50

ctc atc atc cca gtg cct gcc tca gaa aac ccc ttc cgg gag aag aag 246  
 Leu Ile Ile Pro Val Pro Ala Ser Glu Asn Pro Phe Arg Glu Lys Lys



55

60

65

ttc ttc tgc acc atc ctc taa cacccatggc gatgaagcgg gccctttcct 297  
 Phe Phe Cys Thr Ile Leu  
 70 75

gctgtaacag 307

<210> 44  
 <211> 75  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 44

Met Lys Glu Gly Met Ser Asn Asn Ser Thr Thr Ser Ile Ser Gln Ala  
 1 5 10 15

Arg Lys Ala Val Glu Gln Leu Lys Met Glu Ala Cys Met Asp Arg Val  
 20 25 30

Lys Val Ser Gln Ala Ala Ser Asp Leu Leu Ala Tyr Cys Glu Ala His  
 35 40 45

Val Arg Glu Asp Pro Leu Ile Ile Pro Val Pro Ala Ser Glu Asn Pro  
 50 55 60

Phe Arg Glu Lys Lys Phe Phe Cys Thr Ile Leu  
 65 70 75

<210> 45  
 <211> 2666  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<300>  
 <308> BC023729  
 <309> 2003-04-16  
 <313> (1)..(2666)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (252)..(2219)

<400> 45  
 ccacgcgtcc ggccccagcg caacgcgcag cagcctccct cctctttcttc ccgcactgtg 60  
 cgctcctcct gggctagggc gtctggatcg agtcccggag gctaccgcct cccagacaga 120  
 cgacaggtca cctggacgcg agcctgtgtc cgggtctcgt cgttgccggc gcagtcactg 180  
 ggcacaaccg tgggactccg tctgtctcgg attaatcccg gagagccaga gccaacctct 240  
 cccggtcaga g atg cga ccc tca ggg acc gcg aga acc aca ctg ctg gtg 290  
           Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Arg Thr Thr Leu Leu Val  
           1                  5                  10  
 ttg ctg acc gcg ctc tgc gcc gca ggt ggg gcg ttg gag gaa aag aaa 338  
 Leu Leu Thr Ala Leu Cys Ala Ala Gly Gly Ala Leu Glu Glu Lys Lys  
           15                  20                  25  
 gtc tgc caa ggc aca agt aac agg ctc acc caa ctg ggc act ttt gaa 386  
 Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Arg Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu  
           30                  35                  40                  45  
 gac cac ttt ctg agc ctg cag agg atg tac aac aac tgt gaa gtg gtc 434  
 Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Tyr Asn Asn Cys Glu Val Val  
                   50                  55                  60  
 ctt ggg aac ttg gaa att acc tat gtg caa agg aat tac gac ctt tcc 482  
 Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser  
                   65                  70                  75  
 ttc tta aag acc atc cag gag gtg gcc ggc tat gtc ctc att gcc ctc 530  
 Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu  
           80                  85                  90  
 aac acc gtg gag aga atc cct ttg gag aac ctg cag atc atc agg gga 578  
 Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly  
           95                  100                  105  
 aat gct ctt tat gaa aac acc tat gcc tta gcc atc ctg tcc aac tat 626  
 Asn Ala Leu Tyr Glu Asn Thr Tyr Ala Leu Ala Ile Leu Ser Asn Tyr  
           110                  115                  120                  125  
 ggg aca aac aga act ggg ctt agg gaa ctg ccc atg cgg aac tta cag 674  
 Gly Thr Asn Arg Thr Gly Leu Arg Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln  
                   130                  135                  140  
 gaa atc ctg att ggt gct gtg cga ttc agc aac aac ccc atc ctc tgc 722  
 Glu Ile Leu Ile Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ile Leu Cys  
           145                  150                  155

aat atg gat act atc cag tgg agg gac atc gtc caa aac gtc ttt atg Asn Met Asp Thr Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Gln Asn Val Phe Met 160 165 170	770
agc aac atg tca atg gac tta cag agc cat ccg agc agt tgc ccc aaa Ser Asn Met Ser Met Asp Leu Gln Ser His Pro Ser Ser Cys Pro Lys 175 180 185	818
tgt gat cca agc tgt ccc aat gga agc tgc tgg gga gga gga gag gag Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Gly Gly Glu Glu 190 195 200 205	866
aac tgc cag aaa ttg acc aaa atc atc tgt gcc cag caa tgt tcc cat Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser His 210 215 220	914
cgc tgt cgt ggc agg tcc ccc agt gac tgc tgc cac aac caa tgt gct Arg Cys Arg Gly Arg Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala 225 230 235	962
gcg ggg tgt aca ggg ccc cga gag agt gac tgt ctg gtc tgc caa aag Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Gln Lys 240 245 250	1010
ttc caa gat gag gcc aca tgc aaa gac acc tgc cca cca ctc atg ctg Phe Gln Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu 255 260 265	1058
tac aac ccc acc acc tat cag atg gat gtc aac cct gaa ggg aag tac Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr 270 275 280 285	1106
agc ttt ggt gcc acc tgt gtg aag aag tgc ccc cga aac tac gtg gtg Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val 290 295 300	1154
aca gat cat ggc tca tgt gtc cga gcc tgt ggg cct gac tac tac gaa Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Pro Asp Tyr Tyr Glu 305 310 315	1202
gtg gaa gaa gat ggc atc cgc aag tgt aaa aaa tgt gat ggg ccc tgt Val Glu Glu Asp Gly Ile Arg Lys Cys Lys Lys Cys Asp Gly Pro Cys 320 325 330	1250
cgc aaa gtt tgt aat ggc ata ggc att ggt gaa ttt aaa gac aca ctc Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Thr Leu 335 340 345	1298
tcc ata aat gct aca aac atc aaa cac ttc aaa tac tgc act gcc atc Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Tyr Cys Thr Ala Ile	1346

350	355	360	365	
agc ggg gac ctt cac atc ctg cca gtg gcc ttt aag ggg gat tct ttc Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Lys Gly Asp Ser Phe	370	375	380	1394
acg cgc act cct cct cta gac cca cga gaa cta gaa att cta aaa acc Thr Arg Thr Pro Pro Leu Asp Pro Arg Glu Leu Glu Ile Leu Lys Thr	385	390	395	1442
gta aag gaa ata aca ggc ttt ttg ctg att cag gct tgg cct gat aac Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Asp Asn	400	405	410	1490
tgg act gac ctc cat gct ttc gag aac cta gaa ata ata cgt ggc aga Trp Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg	415	420	425	1538
aca aag caa cat ggt cag ttt tct ttg gcg gtc gtt ggc ctg aac atc Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Gly Leu Asn Ile	430	435	440	1586
aca tca ctg ggg ctg cgt tcc ctc aag gag atc agt gat ggg gat gtg Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val	450	455	460	1634
atc att tct gga aac cga aat ttg tgc tac gca aac aca ata aac tgg Ile Ile Ser Gly Asn Arg Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp	465	470	475	1682
aaa aaa ctc ttc ggg aca ccc aat cag aaa acc aaa atc atg aac aac Lys Lys Leu Phe Gly Thr Pro Asn Gln Lys Thr Lys Ile Met Asn Asn	480	485	490	1730
aga gct gag aaa gac tgc aag gcc gtg aac cac gtc tgc aat cct tta Arg Ala Glu Lys Asp Cys Lys Ala Val Asn His Val Cys Asn Pro Leu	495	500	505	1778
tgc tcc tcg gaa ggc tgc tgg ggc cct gag ccc agg gac tgt gtc tcc Cys Ser Ser Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser	510	515	520	1826
tgc cag aat gtg agc aga ggc agg gag tgc gtg gag aaa tgc aac atc Cys Gln Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Glu Lys Cys Asn Ile	530	535	540	1874
ctg gag ggg gaa cca agg gag ttt gtg gaa aat tct gaa tgc atc cag Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln	545	550	555	1922

tgc cat cca gaa tgt ctg ccc cag gcc atg aac atc acc tgt aca ggc Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly 560 565 570	1970
agg gga cca gac aac tgc atc cag tgt gcc cac tac att gat ggc cca Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro 575 580 585	2018
cac tgt gtc aag acc tgc cca gct ggc atc atg gga gag aac aac act His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Ile Met Gly Glu Asn Asn Thr 590 595 600 605	2066
ctg gtc tgg aag tat gca gat gcc aat aat gtc tgc cac cta tgc cac Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Asn Asn Val Cys His Leu Cys His 610 615 620	2114
gcc aac tgt acc tat gga tgt gct ggg cca ggt ctt caa gga tgt gaa Ala Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Ala Gly Pro Gly Leu Gln Gly Cys Glu 625 630 635	2162
gtg tgg cca tct ggg tac gtt caa tgg cag tgg atc tta aag acc ttt Val Trp Pro Ser Gly Tyr Val Gln Trp Gln Trp Ile Leu Lys Thr Phe 640 645 650	2210
tgg atc taa gaccagaagc catctctgac tcccctctca ccttccagtt Trp Ile 655	2259
tcttccaaat cctctgggcc agccagaggt ctcagattct gccctcttgc cctgtgcca	2319
ccttggtgac cactggacag catatgtgat ggctactgct agtgccagct tcacaagagg	2379
ttaacactac ggactagcca ttcttctat gtatctgttt ctgcaaatac agccgcttta	2439
cttaagtctc agcacttctt agtctctctt tttcctctca gtagcccaag gggtcatgtc	2499
acaaacatgg tgtgaagggc tactttgtca aatgaaaagg tctatcttgg ggggcatttt	2559
tttcttttct ttttttcttg aaacacattg cccagcaaag ccaataaatt tctctcatca	2619
ttttgtttct gataaattct tactattgat aaaaaaaaaa aaaaaaa	2666

<210> 46  
 <211> 655  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 46

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Arg Thr Thr Leu Leu Val Leu Leu Thr  
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Ala Ala Gly Gly Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln  
 20 25 30

Gly Thr Ser Asn Arg Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe  
 35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Tyr Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn  
 50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys  
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val  
 85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Ala Leu  
 100 105 110

Tyr Glu Asn Thr Tyr Ala Leu Ala Ile Leu Ser Asn Tyr Gly Thr Asn  
 115 120 125

Arg Thr Gly Leu Arg Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu  
 130 135 140

Ile Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ile Leu Cys Asn Met Asp  
 145 150 155 160

Thr Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Gln Asn Val Phe Met Ser Asn Met  
 165 170 175

Ser Met Asp Leu Gln Ser His Pro Ser Ser Cys Pro Lys Cys Asp Pro  
 180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Gly Gly Glu Glu Asn Cys Gln  
 195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser His Arg Cys Arg  
210 215 220

Gly Arg Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys  
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Gln Lys Phe Gln Asp  
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro  
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly  
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His  
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Pro Asp Tyr Tyr Glu Val Glu Glu  
305 310 315 320

Asp Gly Ile Arg Lys Cys Lys Lys Cys Asp Gly Pro Cys Arg Lys Val  
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Thr Leu Ser Ile Asn  
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Tyr Cys Thr Ala Ile Ser Gly Asp  
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Lys Gly Asp Ser Phe Thr Arg Thr  
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Arg Glu Leu Glu Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu  
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Asp Asn Trp Thr Asp  
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln  
420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Gly Leu Asn Ile Thr Ser Leu  
435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser  
450 455 460

Gly Asn Arg Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Phe Gly Thr Pro Asn Gln Lys Thr Lys Ile Met Asn Asn Arg Ala Glu  
485 490 495

Lys Asp Cys Lys Ala Val Asn His Val Cys Asn Pro Leu Cys Ser Ser  
500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Gln Asn  
515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Glu Lys Cys Asn Ile Leu Glu Gly  
530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro  
545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro  
565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val  
580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Ile Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp  
595 600 605



Lys Tyr Ala Asp Ala Asn Asn Val Cys His Leu Cys His Ala Asn Cys  
610 615 620

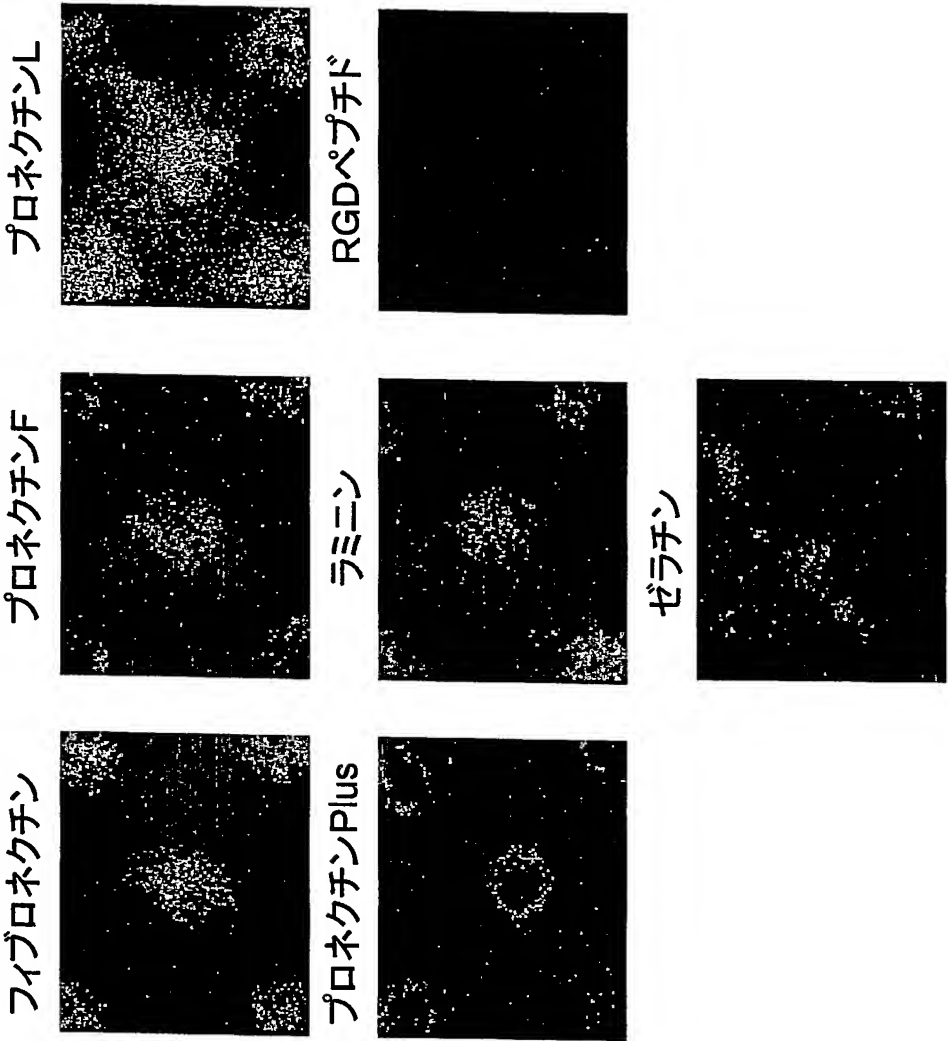
Thr Tyr Gly Cys Ala Gly Pro Gly Leu Gln Gly Cys Glu Val Trp Pro  
625 630 635 640

Ser Gly Tyr Val Gln Trp Gln Trp Ile Leu Lys Thr Phe Trp Ile  
645 650 655

1

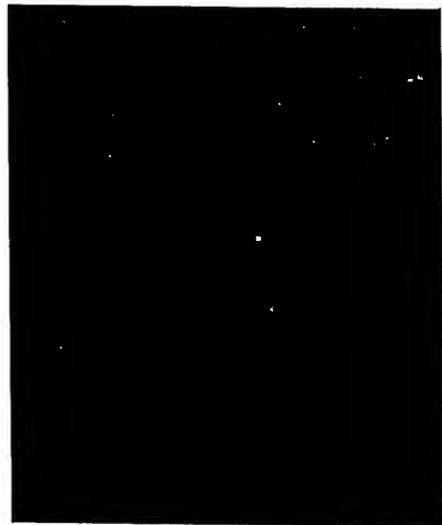
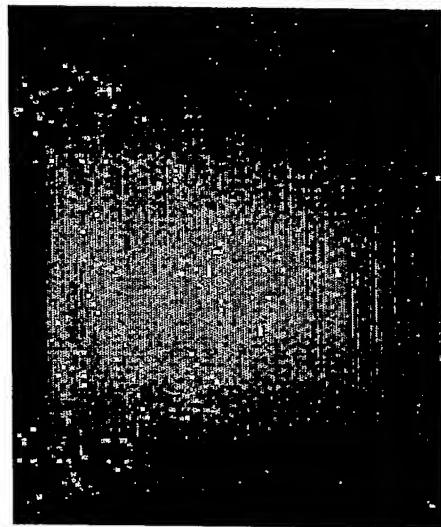
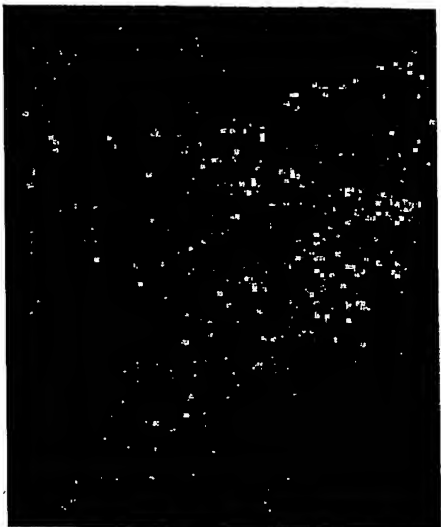
【書類名】 図面  
【図 1】

トランスフェクション効率に対する、付着した分子の効果 (HEK細胞)  
HEK293細胞に対してEffectene試薬を用いてpEGFP-N1をトランスフェクションした

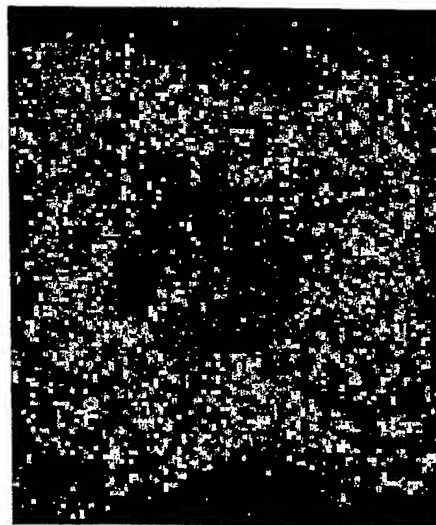
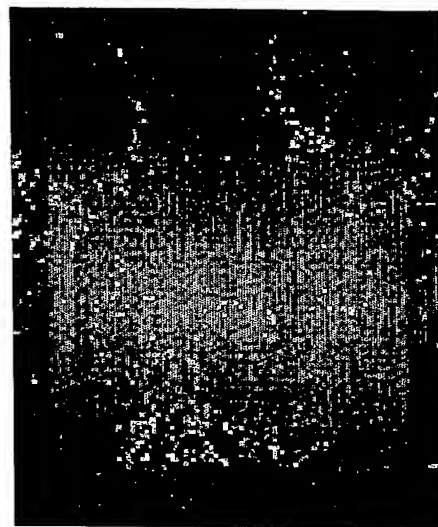
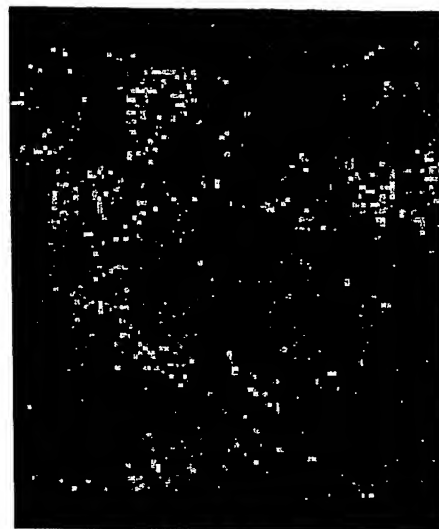


【図 2】

フィブロネクチン (43kDaフラグメント)

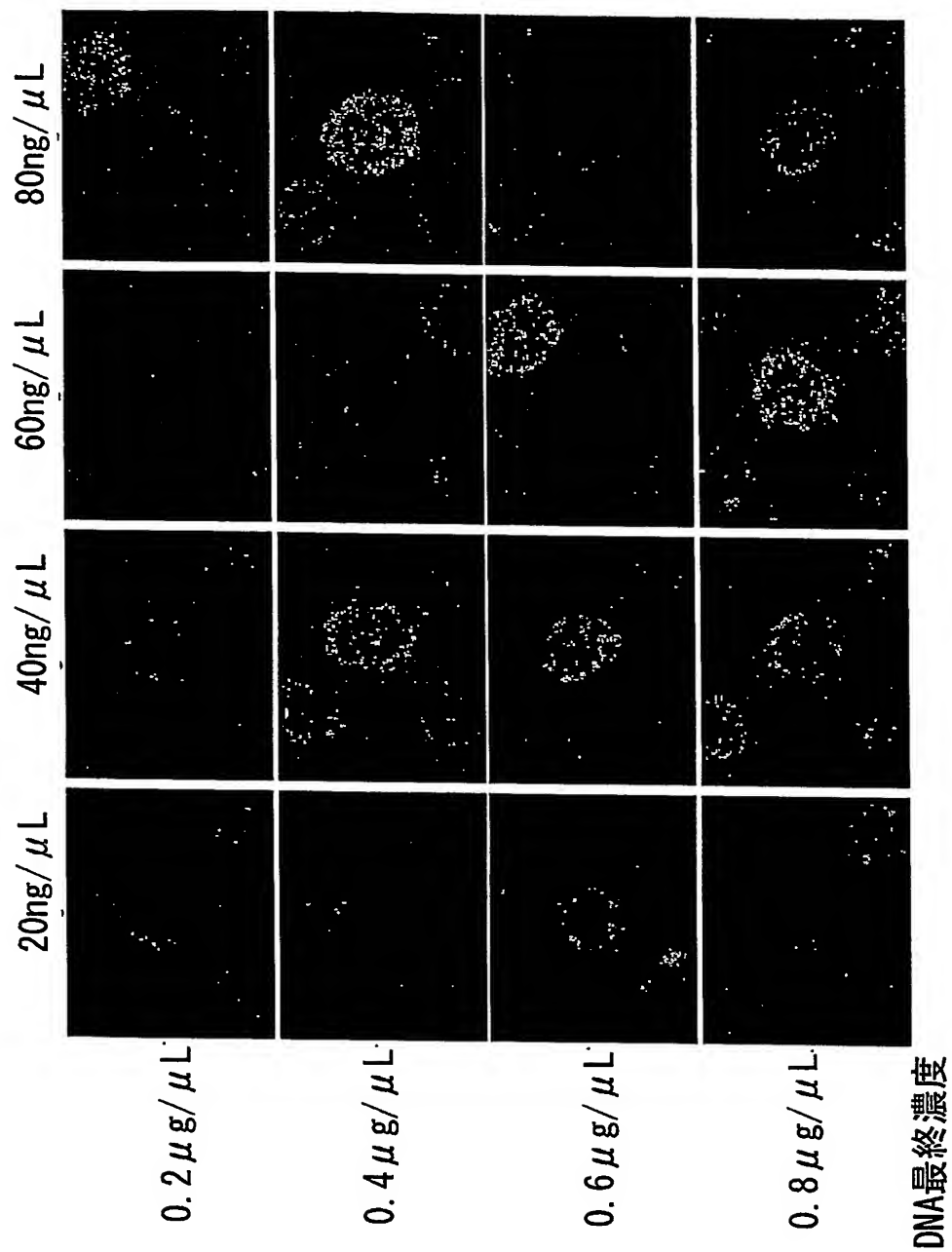


フィブロネクチン (72kDaフラグメント)

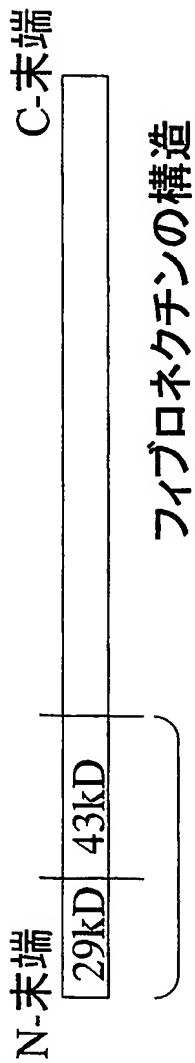


【図3】

フィブロネクチン最終濃度 (29kDaフラグメント)

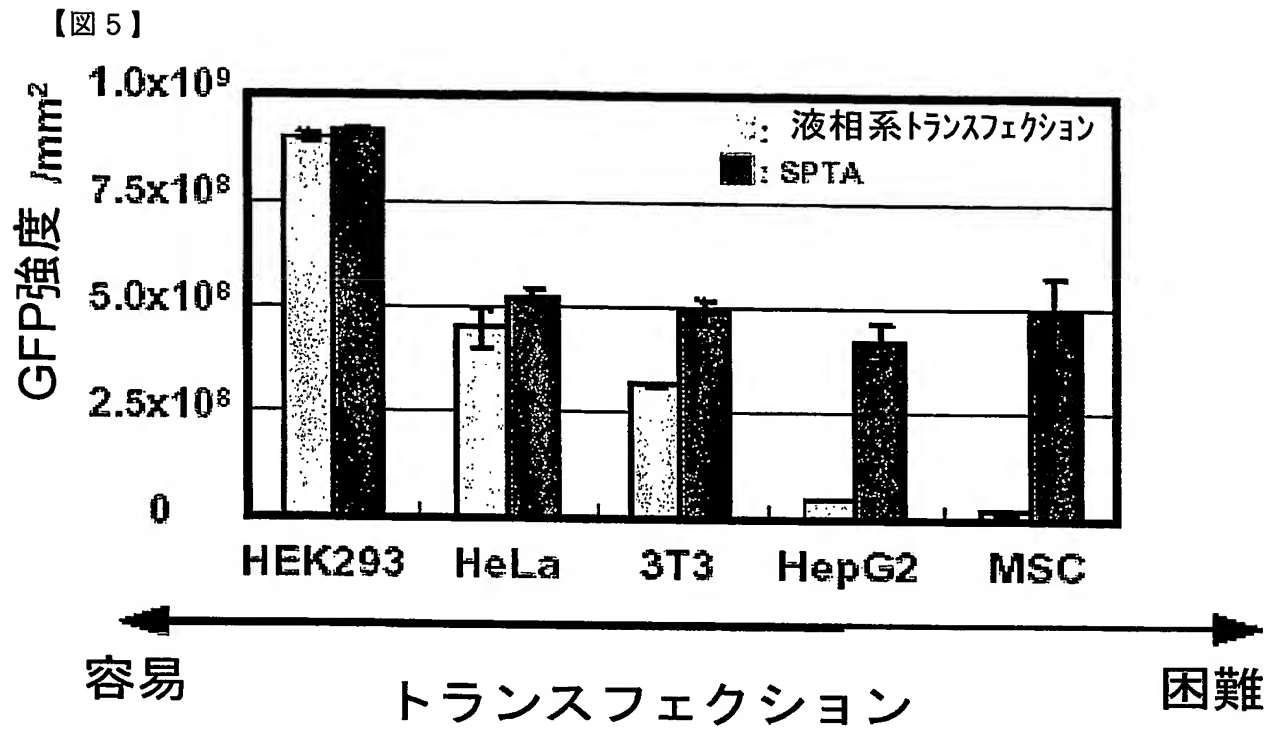


【図4】

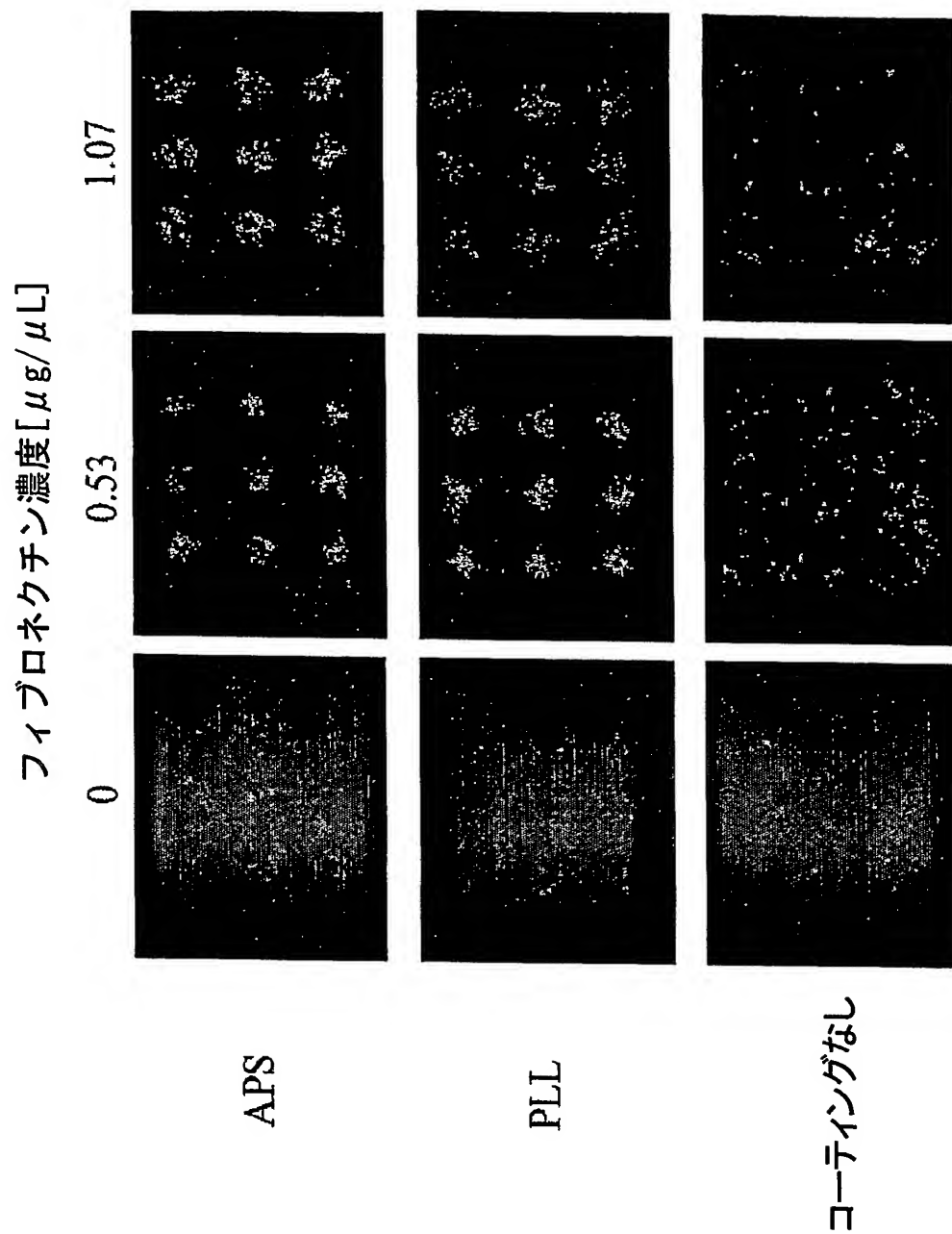


フラグメント	結合分子
29 kD	アクチン, ヘパリン, フィブリンなど
43 kD	コラーゲン(ゼラチン)

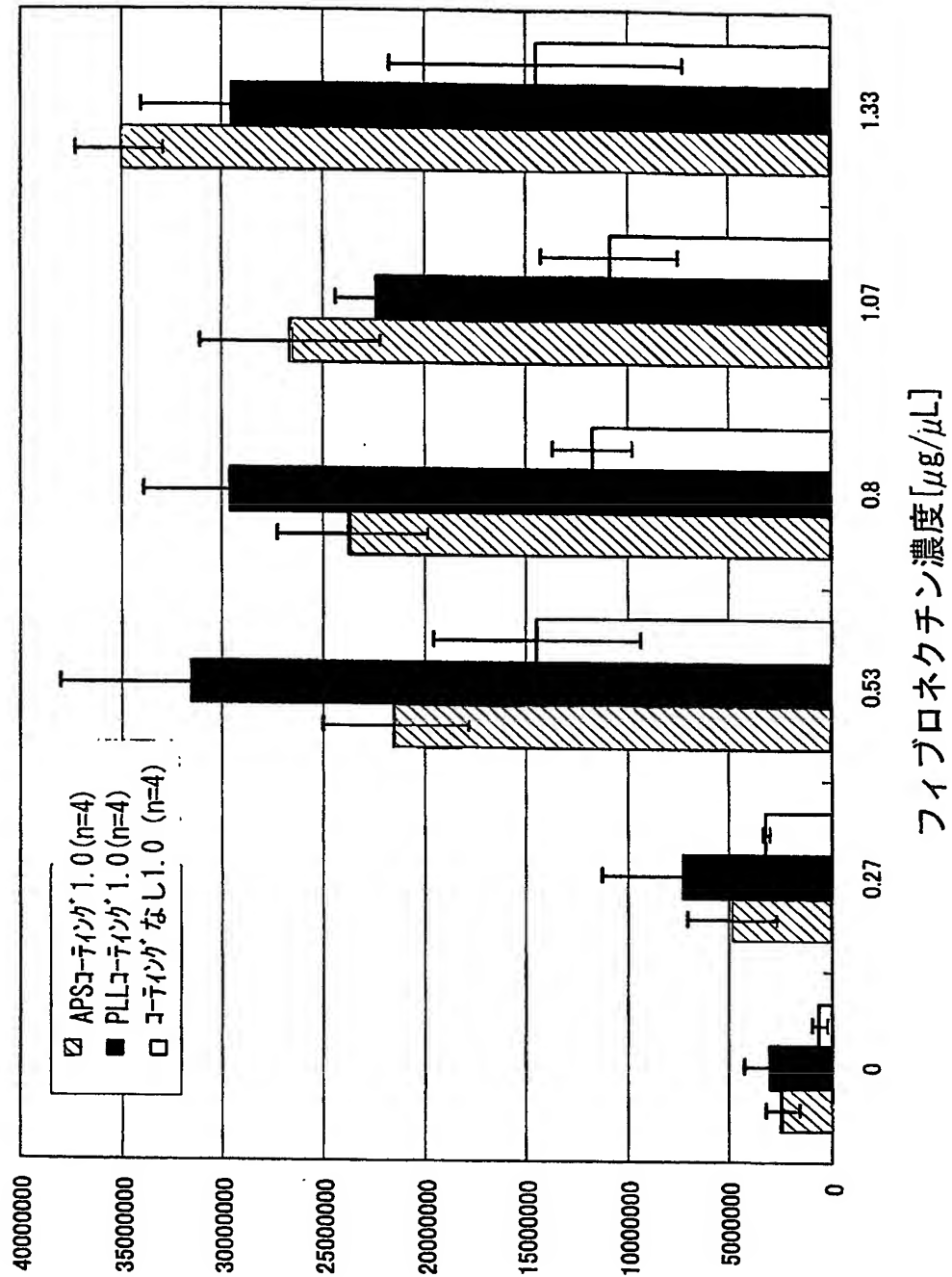
	29kD	43 kD	72 kD
トランスフェクション効率	◎	○	◎
相互夾雑	なし	多い	多い
再現性	△	×	×



【図 6】

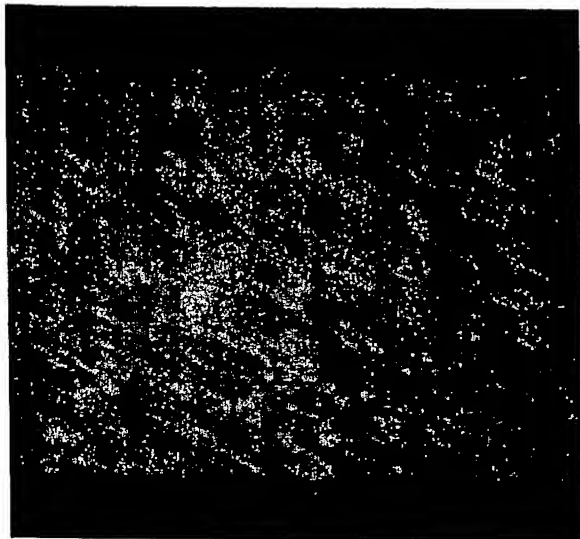


【図 7】

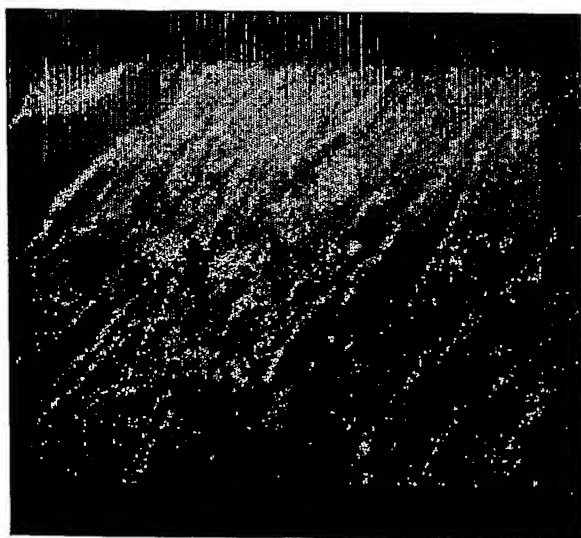




【図 8】

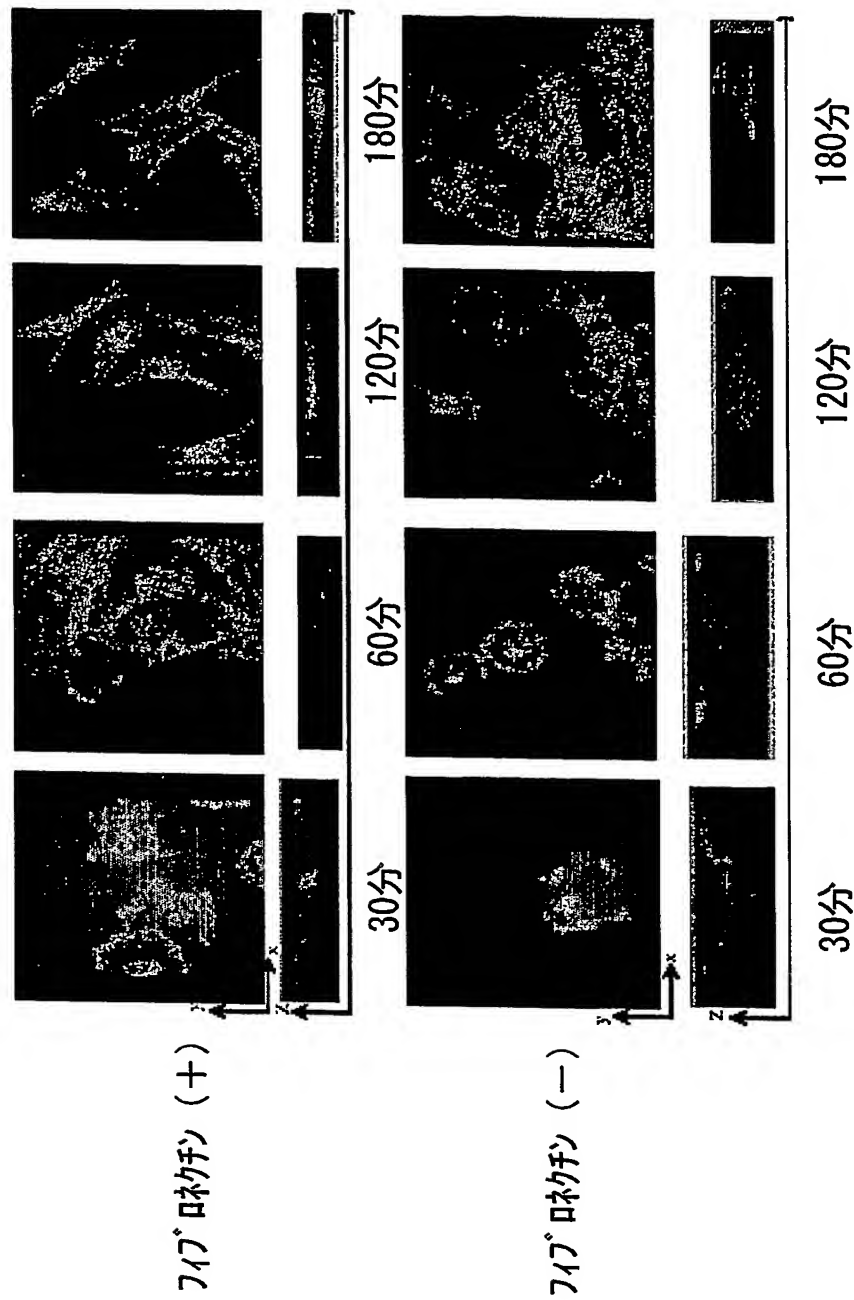


フィブロンクチン (-)



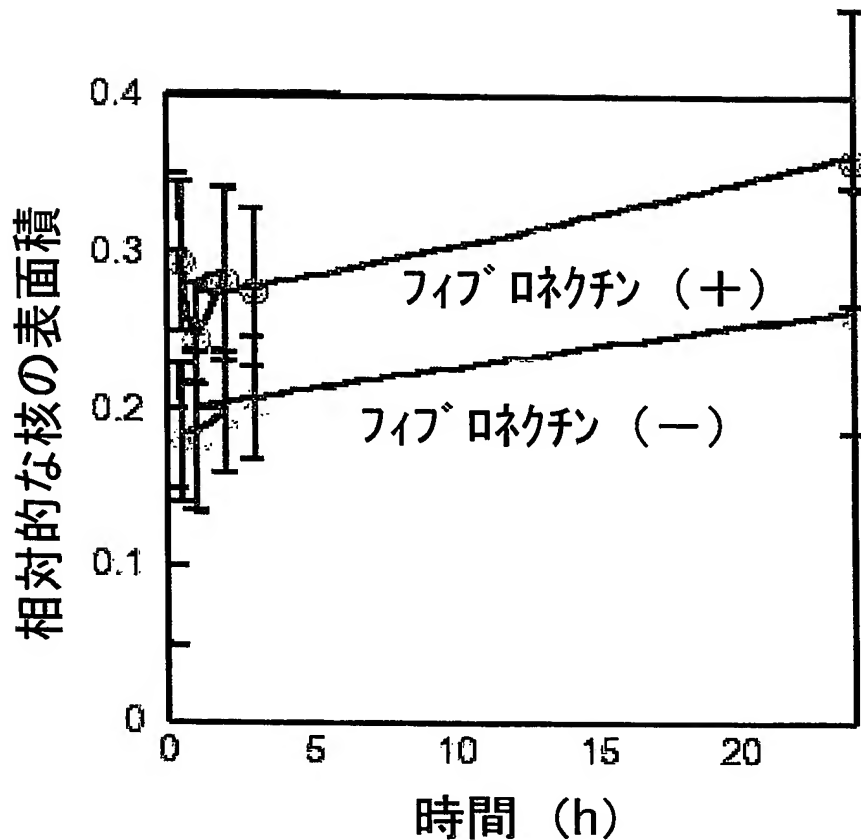
フィブロンクチン (+)

【図 9】



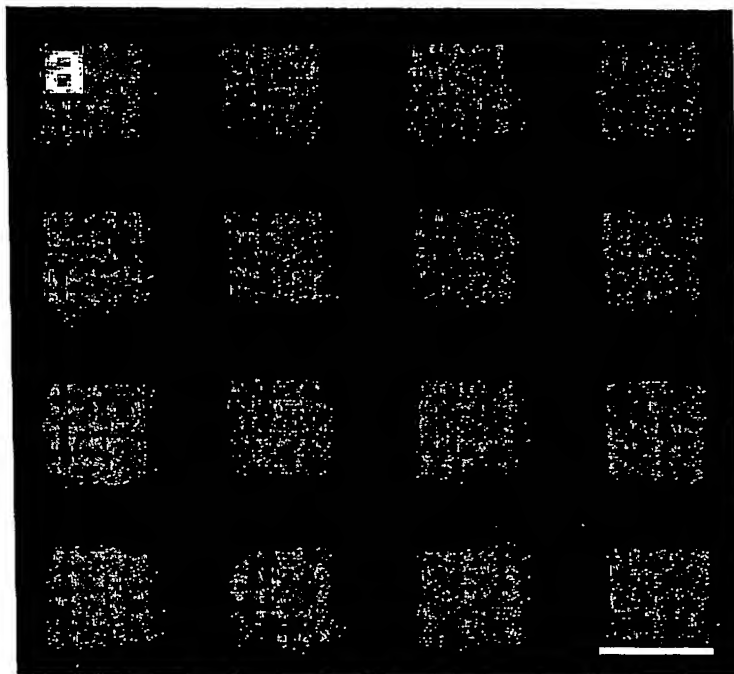
共焦点レーザー走査顕微鏡によるヒト間葉系幹細胞(hMSC)の切片観察。hMSCを、4%のPFAを用い、数回インキュベートして、固定化した。青色蛍光(核:SYTO61)および赤色蛍光(核:テキサスレッド-Xフロロイジン)を、共焦点レーザー走査顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss Co., Ltd, ピンホールサイズ=1.0; 画像間隔=0.4)を用いて、得た。

【図10】

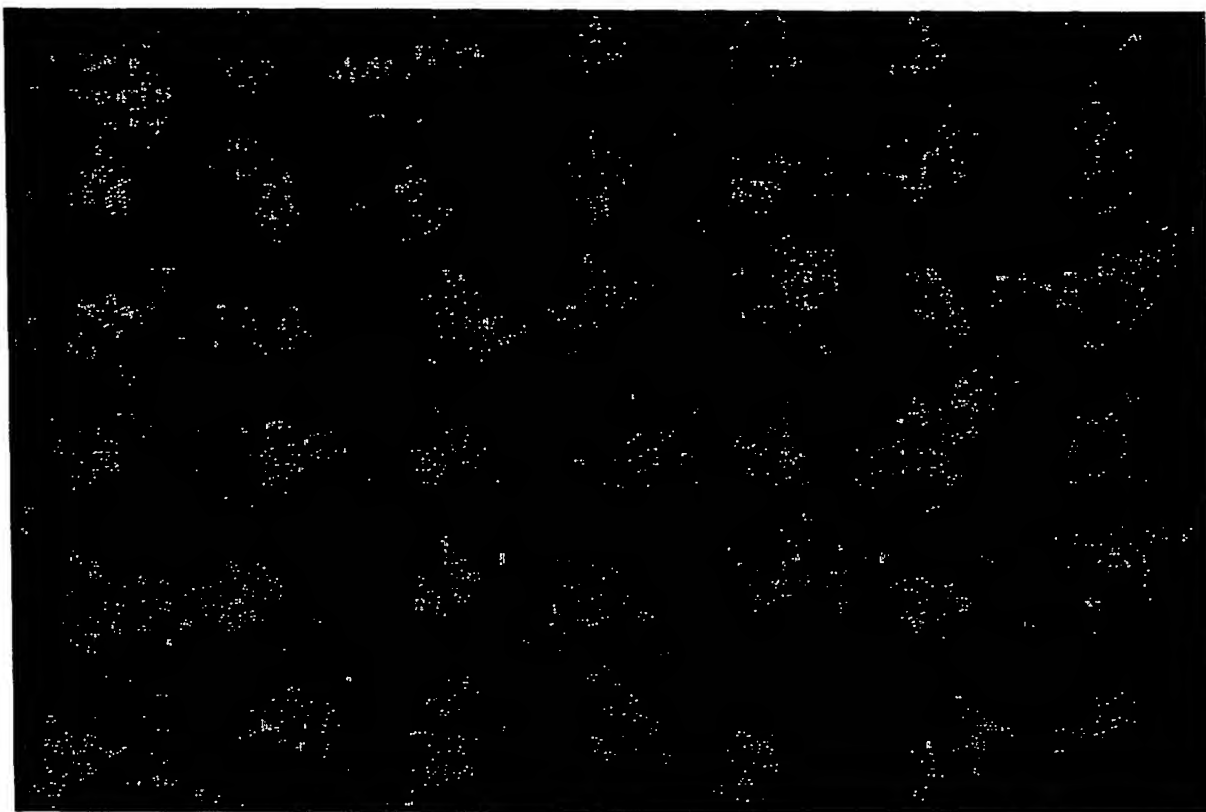


共焦点レーザー走査顕微鏡画像の切片観察によって決定された相対的な核の表面積。ヒト間葉系幹細胞を、4%のPFAを用い、数回インキュベートして、固定化した。

【図 11】



【図 12】



【図 13】

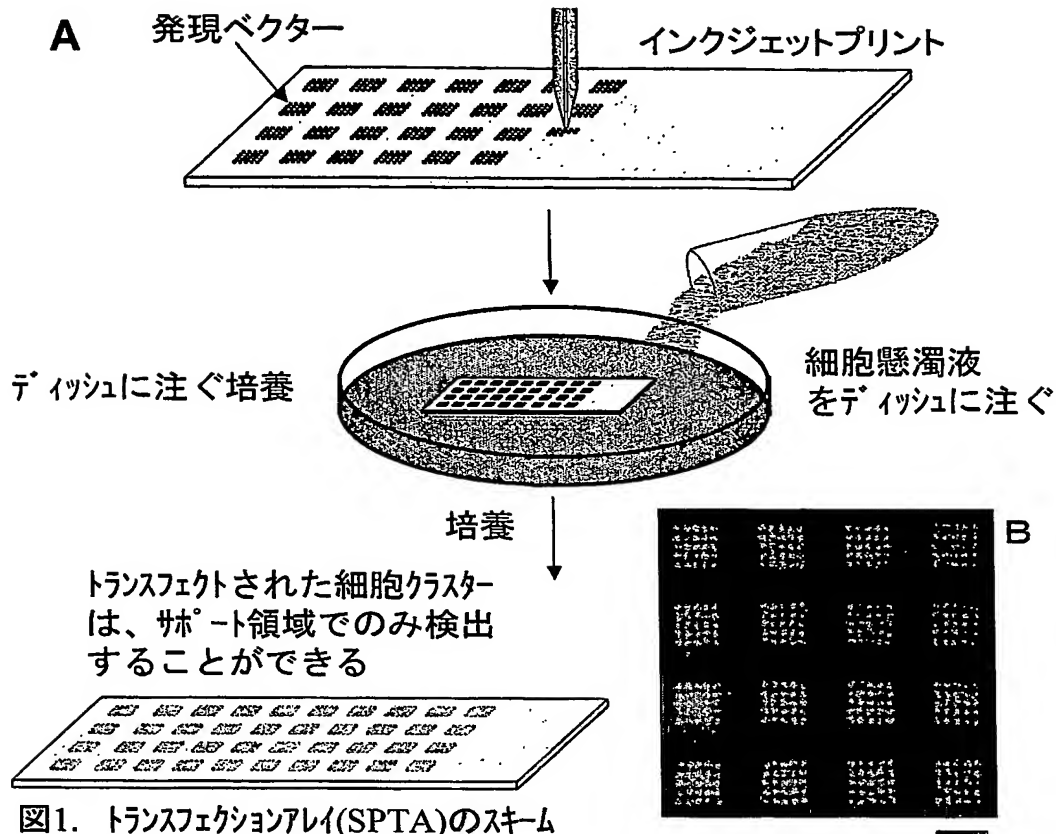
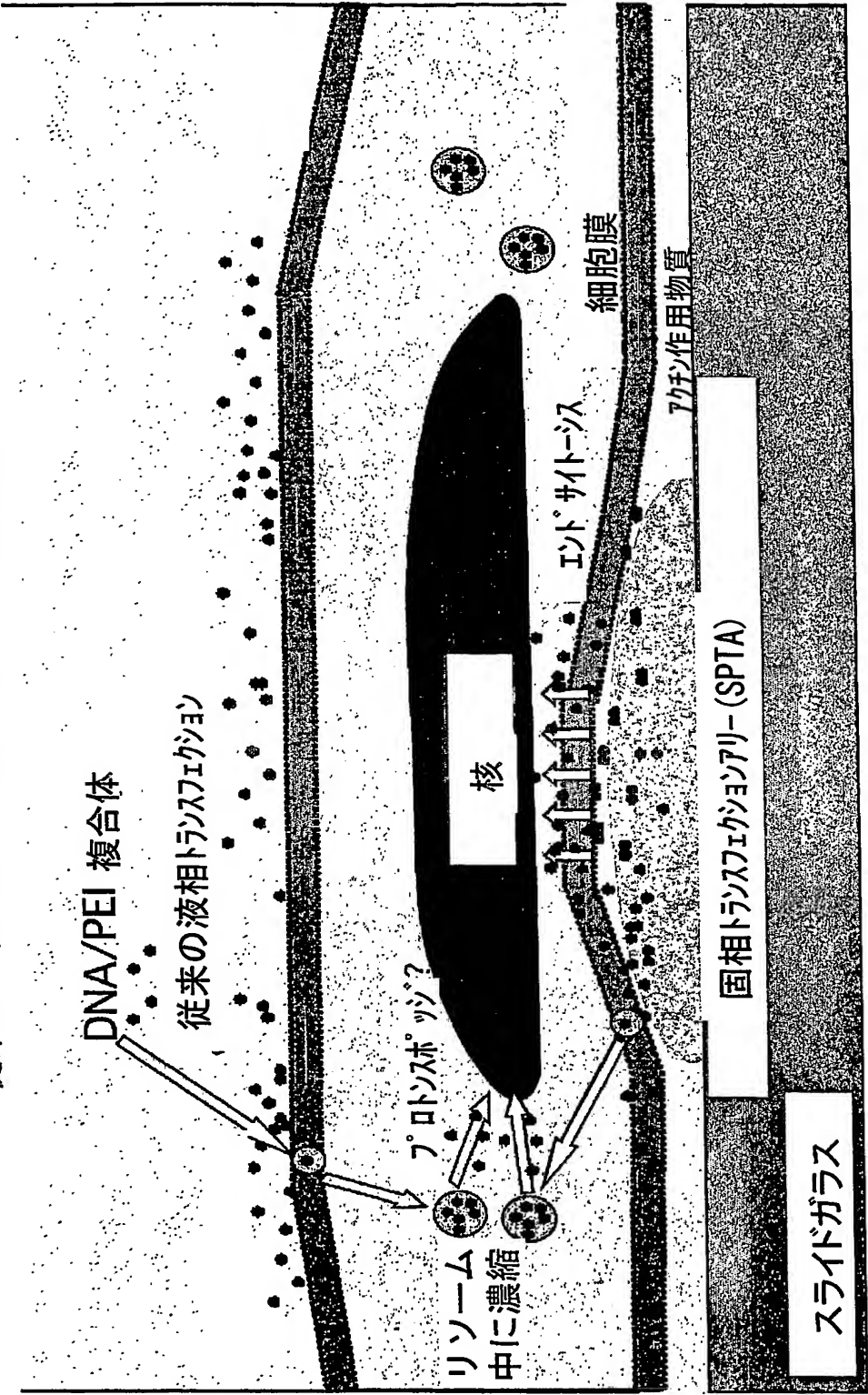


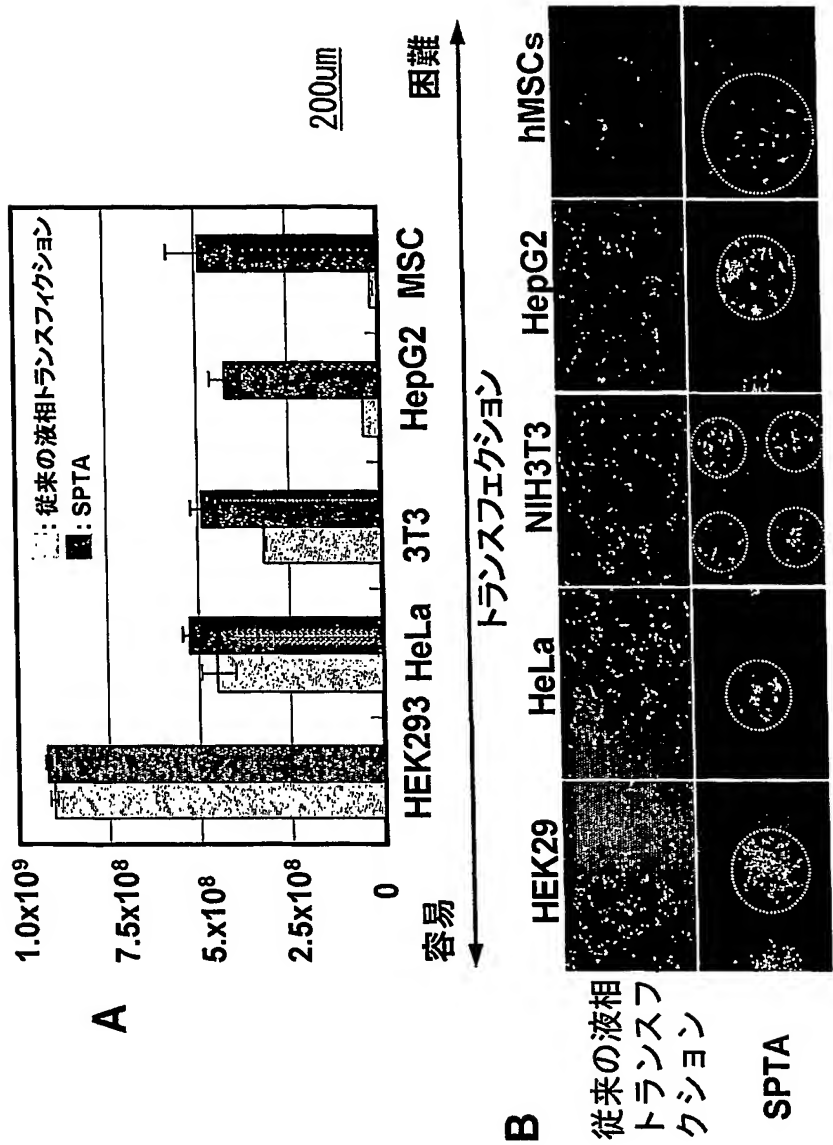
図1. トランスフェクションアレイ(SPTA)のスキーム  
(A)SPTA判定のアウトライン  
(B)HEK293細胞株でのSPTAの結果 バ ーは3mm

【図13C】

従来のトランスフェクションとSPTAとの違い



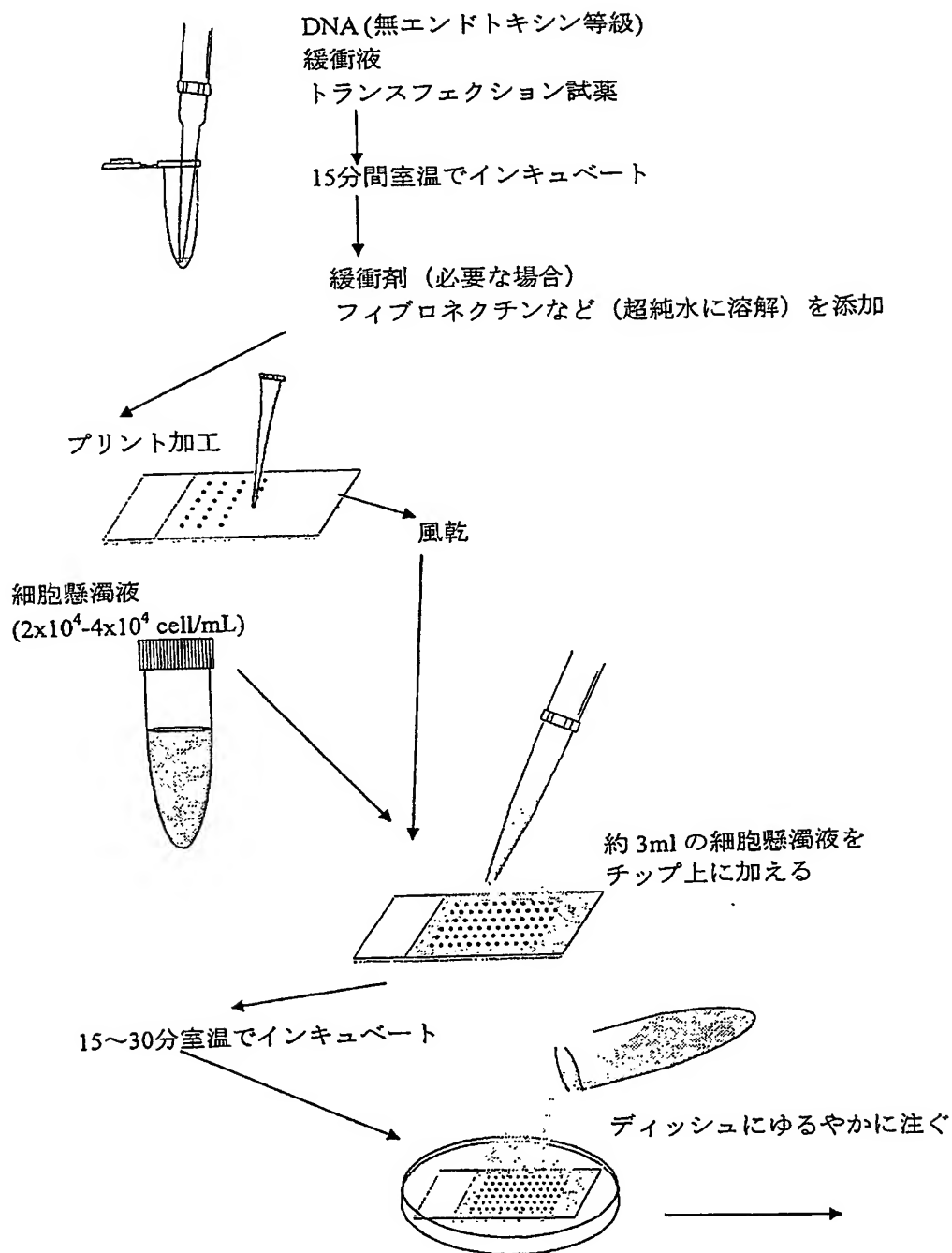
【図 14】



従来の液相トランスフェクションとSPTAとの間の比較。A)測定された蛍光/m<sup>2</sup>5種の細胞株についてのA)に対応する。B)EGFP発現細胞の蛍光写真。白色の円状のものは、プラスミドDNAプリント領域にあたる。この領域の外の領域の細胞はEGFPを発現しているが、プリント領域以外の領域にも細胞は付着

【図 14 C】

## 固相トランスフェクション法





## 【図 14 D】

## HEK293

DMEM (無血清)	9.5	μL
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5	μL
TransFast (1mg/mL)	9.0	μL
DMEM (serum free)	5.0	μL
フィブロネクチン(4mg/mL)	5.0	μL
最終容量	30.0	μL

## HEK293 用スチーム

## 1.5mL マイクロチューブ

↓←DMEM  
 ↓←プラスミド DNA  
 混合 2~3 日, 37℃, 5%CO<sub>2</sub> で  
 インキュベート  
 ↓←TransFast  
 完全に混合し 15 分室温で  
 インキュベート  
 ↓←DMEM  
 ↓←フィブロネクチン  
 完全に混合  
 ↓  
 プリント準備完了

## HeLa, NIH3T3-3, HepG2

DMEM (無血清)	14.5	μL
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5	μL
Lipofectamine2000	4.5	μL
DMEM (serum free)	5.0	μL
フィブロネクチン(4mg/mL)	5.0	μL
最終容量	30.0	μL

## HeLa, NIH3T3-3, および HepG2 用スチーム

## 1.5mL マイクロチューブ

↓←DMEM  
 ↓←プラスミド DNA  
 混合  
 ↓←Lipofectamine2000  
 完全に混合し 15 分室温で  
 インキュベート  
 ↓←DMEM  
 ↓←フィブロネクチン  
 完全に混合  
 ↓  
 プリント準備完了

## hMSCs

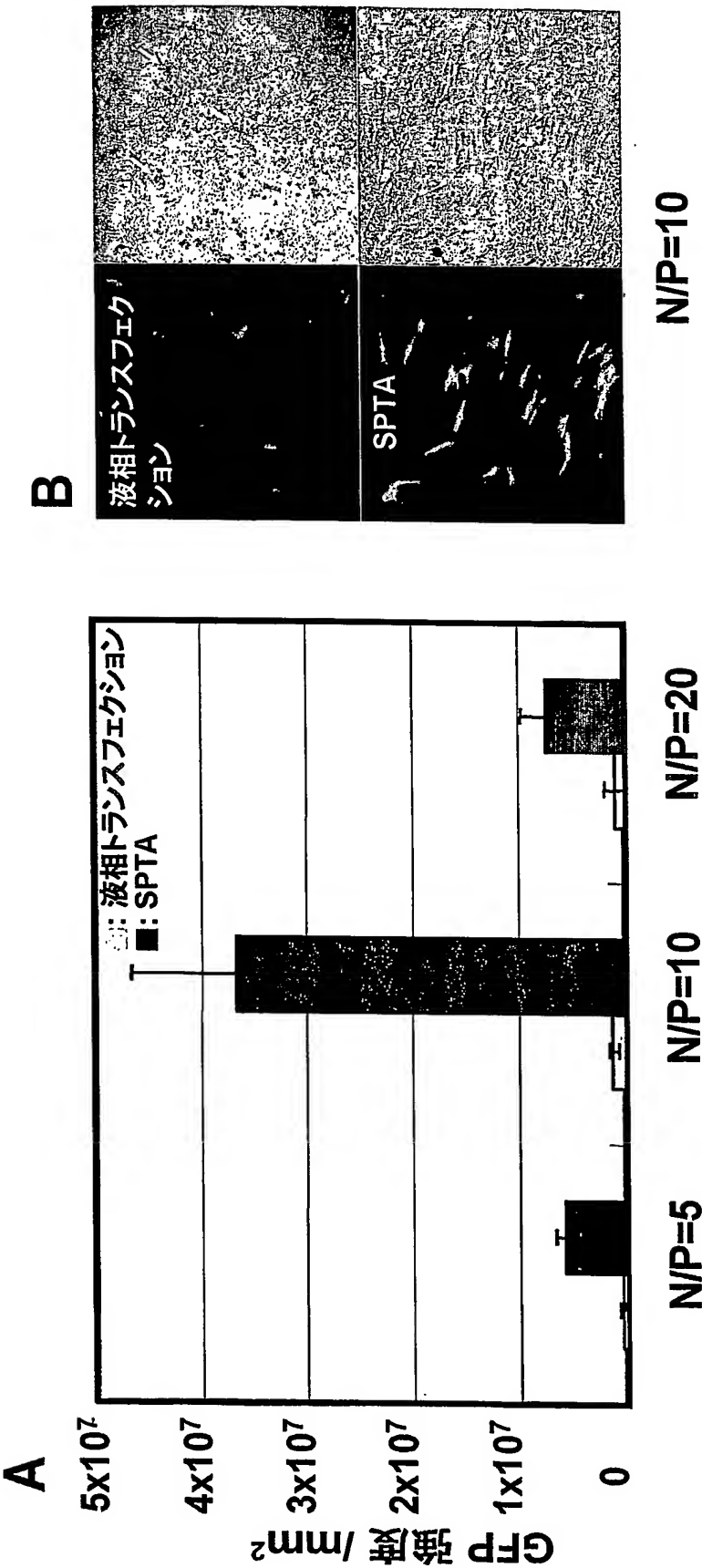
	N/P=5	N/P=10	N/P=20	
DMEM (無血清)	12.75	12.0	10.5	μL
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5	1.5	1.5	μL
JetPEI (x4) conc.	0.75	1.5	3.0	μL
フィブロネクチン(4mg/mL)	5.0	5.0	5.0	μL
最終容量	20.0	20.0	20.0	μL

## hMSCs 用スチーム

## 1.5mL マイクロチューブ

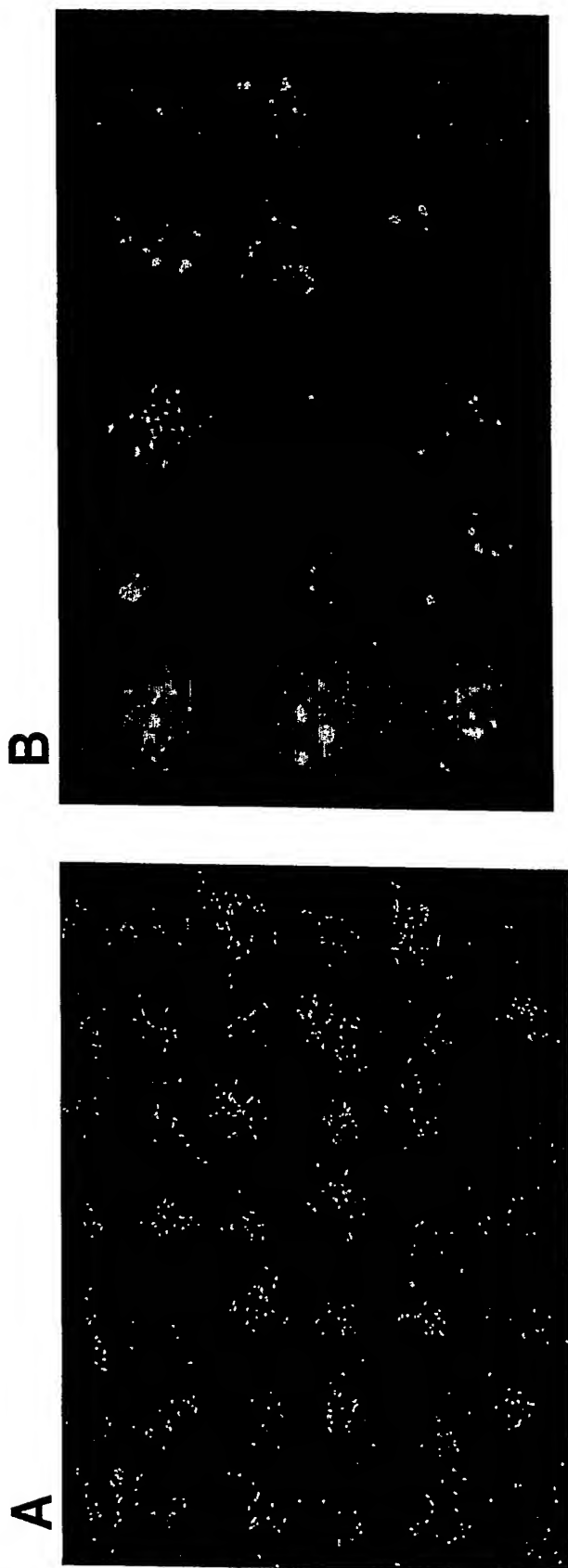
↓←DMEM  
 ↓←プラスミド DNA  
 混合  
 ↓←jetPEI  
 完全に混合し 15 分室温で  
 インキュベート  
 ↓←フィブロネクチン  
 完全に混合  
 ↓  
 プリント準備完了

【図 15】



使用するN/P比によるhMSCのトランスフェクション効率。  
従来の液相トランスフェクションの場合には (B上) hMSC細胞は死に、SPTAの場合は細胞形態は正常である。

【図 16】



相互夾雑についての研究: pEGFP-N1およびpDsRed2-N1を、市松模様にプリントし、そしてhMSC (パネルA) またはHEK293 (パネルB) を培養した。

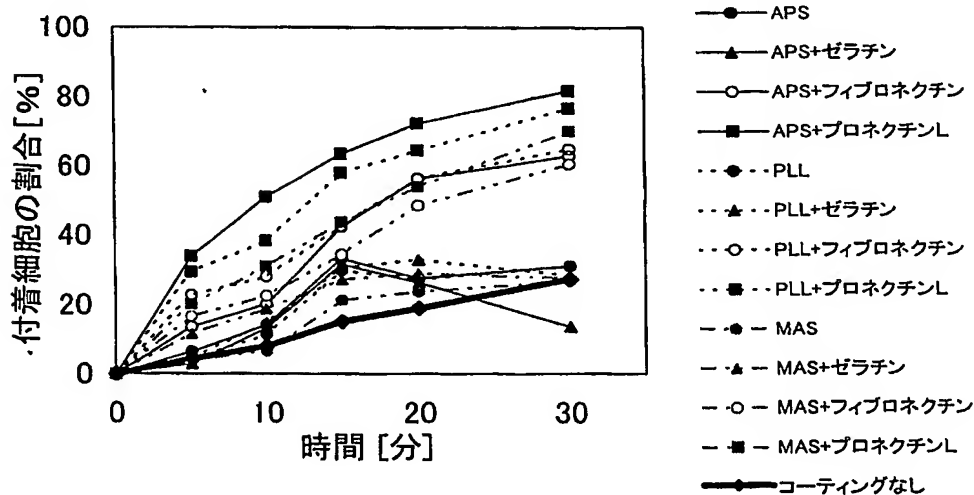
【図 16 C】

細胞接着数

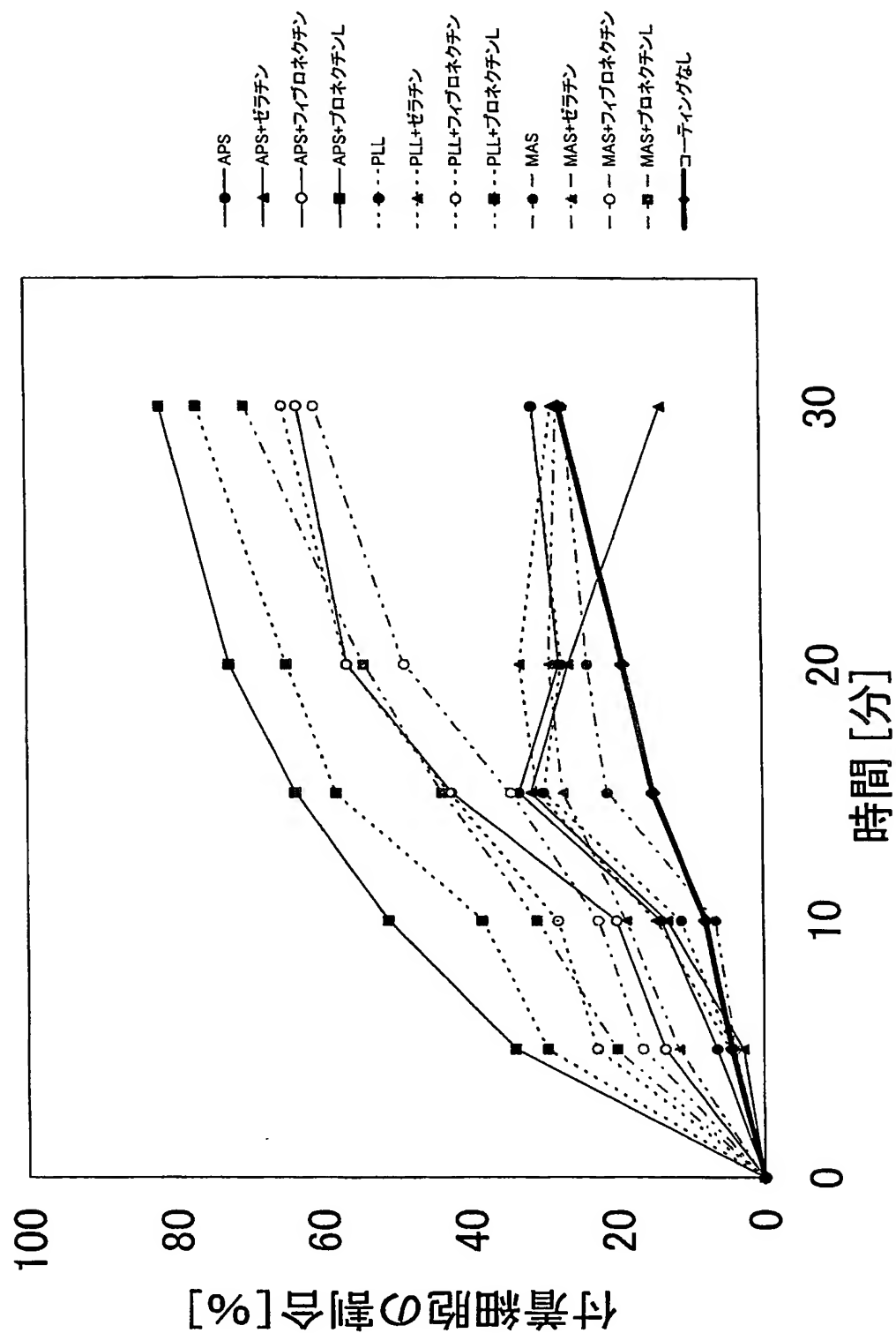
	時間(分)					
	0	5	10	15	20	30
APS	235	220	202	157	170	162
APS+ゼラチン	212	206	184	145	156	183
APS+フィブロネクチン	229	198	183	132	100	85
APS+プロネクチンL	257	170	126	94	71	47
PLL	231	221	205	162	168	159
PLL+ゼラチン	218	208	186	151	146	156
PLL+フィブロネクチン	225	174	162	129	98	79
PLL+プロネクチンL	214	151	132	90	76	50
MAS	231	222	216	182	176	169
MAS+ゼラチン	224	198	182	163	159	162
MAS+フィブロネクチン	218	182	169	143	112	86
MAS+プロネクチンL	220	176	152	124	101	66
コーティングなし	226	216	208	192	183	164

細胞接着率(付着細胞の割合(%))

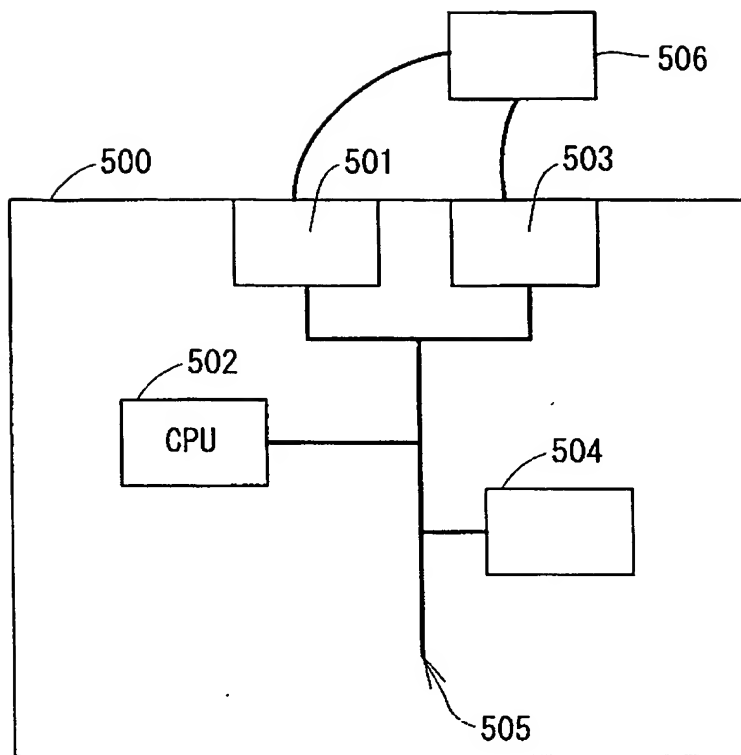
	時間(分)					
	0	5	10	15	20	30
APS	0	6.382979	14.04255	33.19149	27.65957	31.06383
APS+ゼラチン	0	2.830189	13.20755	31.60377	26.41509	13.67925
APS+フィブロネクチン	0	13.53712	20.08734	42.35808	56.33188	62.8821
APS+プロネクチンL	0	33.85214	50.97276	63.42412	72.37354	81.71206
PLL	0	4.329004	11.25541	29.87013	27.27273	31.16883
PLL+ゼラチン	0	4.587156	14.6789	30.73394	33.02752	28.44037
PLL+フィブロネクチン	0	22.66667	28	42.66667	56.44444	64.88889
PLL+プロネクチンL	0	29.43925	38.31776	57.94393	64.48598	76.63551
MAS	0	3.896104	6.493506	21.21212	23.80952	26.83983
MAS+ゼラチン	0	11.60714	18.75	27.23214	29.01786	27.67857
MAS+フィブロネクチン	0	16.51376	22.47706	34.40367	48.62385	60.55046
MAS+プロネクチンL	0	20	30.90909	43.63636	54.09091	70
コーティングなし	0	4.424779	7.964602	15.04425	19.02655	27.43363



【図 16 D】

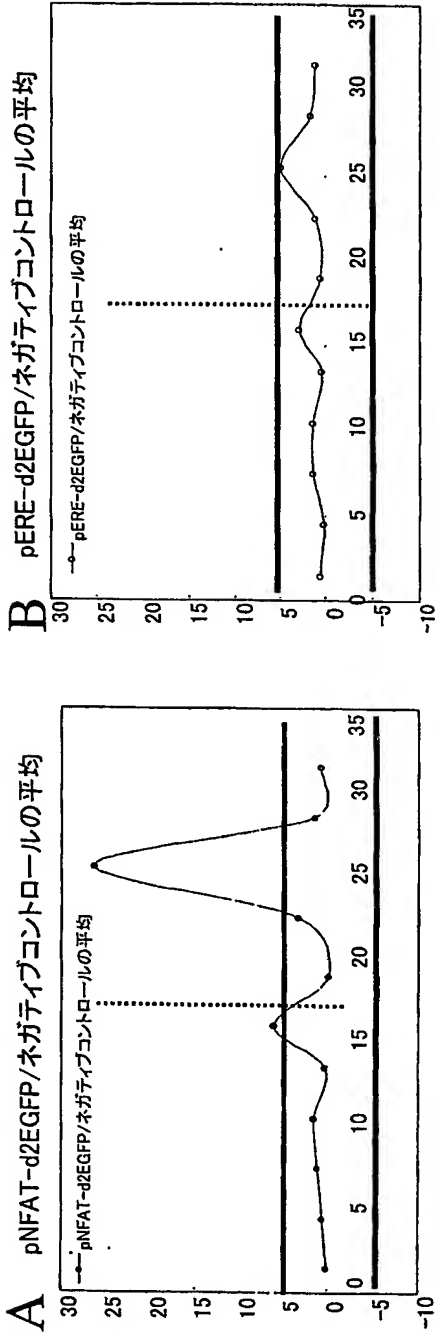


【図 17】



【図18A】

数理的解析法



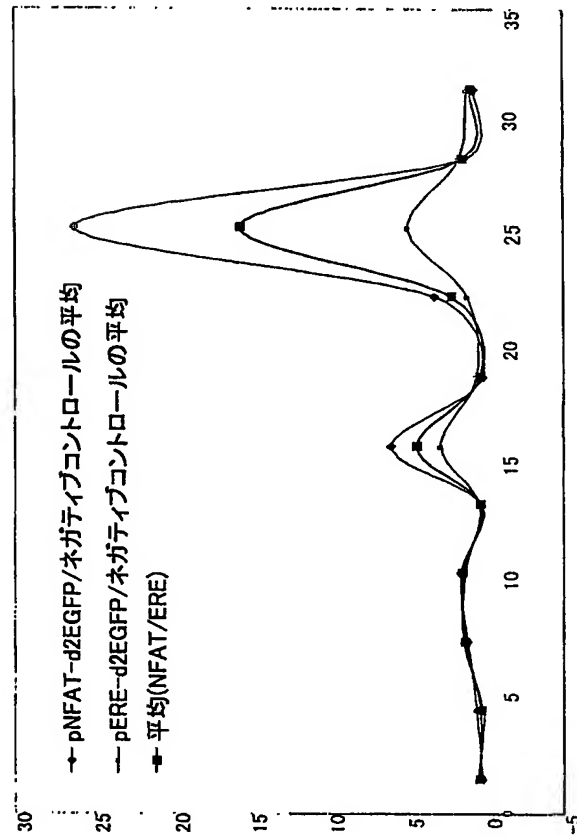
A及びBのようなプロモーターのプロファイルを蛍光強度の経時変化を測定することにより取得する。尚、このプロファイルは、細胞や培地の自家蛍光を用いて正規化してある。この後に、レポーター発現変動の振幅を比較するために、振幅幅≧5以上(TH≧5)の発現変動を状態が変化したと判断した。また、分化誘導開始初期(0-17.5時間)と後期(17.5-31.5時間)及び、トータル(0-31.5時間)の区間に区切って、振幅幅=5以上(TH≧5)の発現変動観察したものを(+)、それ以下の変動であったものを(-)と定義した。この定義から、A及びBのプロファイルは、以下の表のように評価された。

	0-31.5時間	17.5-31.5時間	0-17.5時間
A	+	+	+
B	+	+	-

任意のレポーターの抽出時(A+B+...n)では、n個の波型を積算し、これをnで割った平均の波形を作成し、閾値以上の変動を変化と見なした。

【図18B】

## 数理的解析法



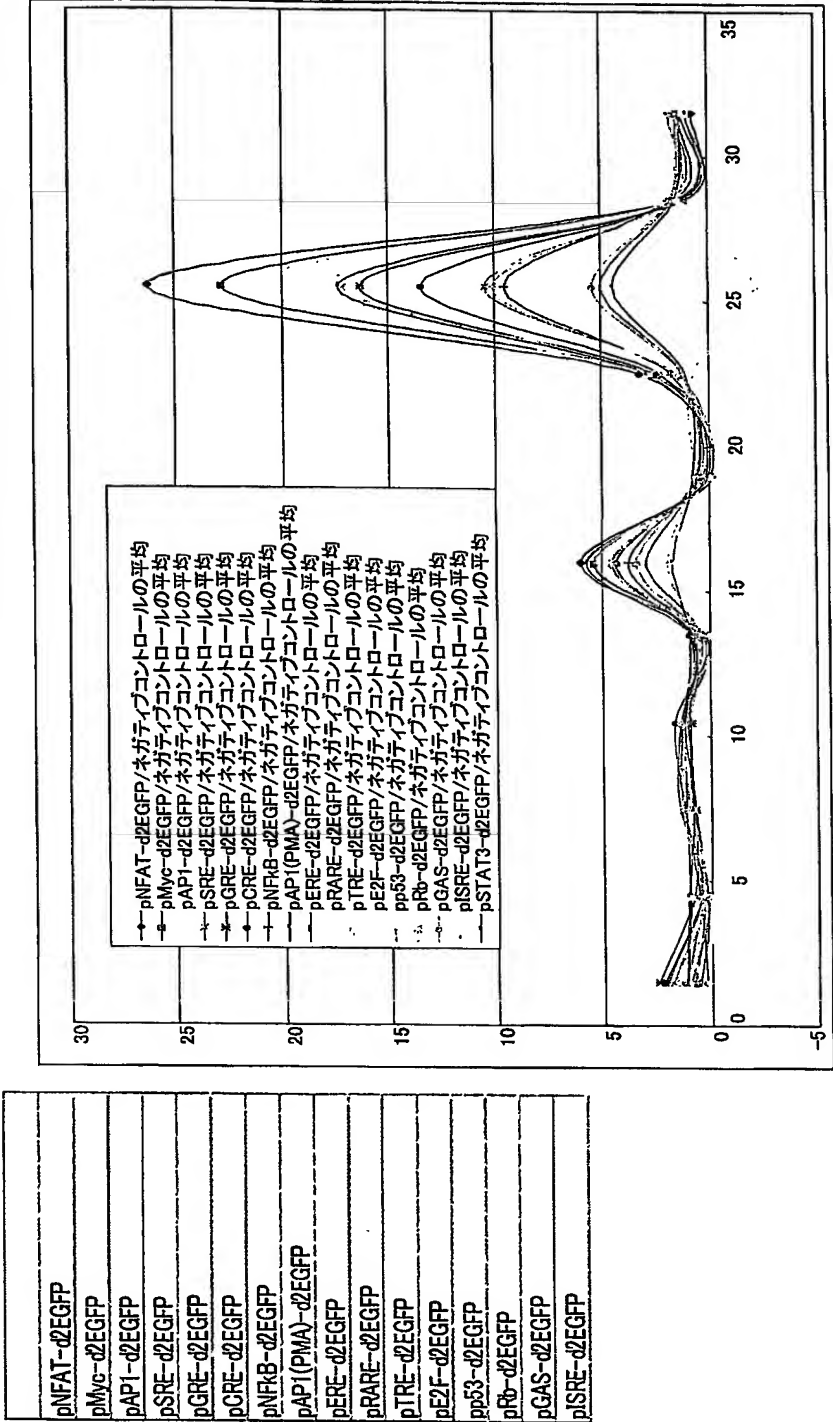
任意のレポーターの抽出時(A+B+...n)では、n個の波型を積算し、これをnで割った平均の波型を作成し、閾値以上の変動を变化と見なした。左図は、2つのレポータープロファイルを積算し、その平均波形を赤線で描いたものである。平均プロファイルの変動が5以上になったものを発現変動と見なして評価した。すると、以下の表のように、抽出された2レポーターの変動を評価することが出来る。

	0-31.5時間	17.5-31.5時間	0-17.5時間
NFAT	+	+	+
ERE	+	-	-
NFAT/ERE	+	+	-



【図 19】

間葉系幹細胞の骨芽細胞分化及び、未分化維持条件において左に示した17種類  
の転写因子をレポーターとし、これらの発現プロファイルを経時的に取得した。

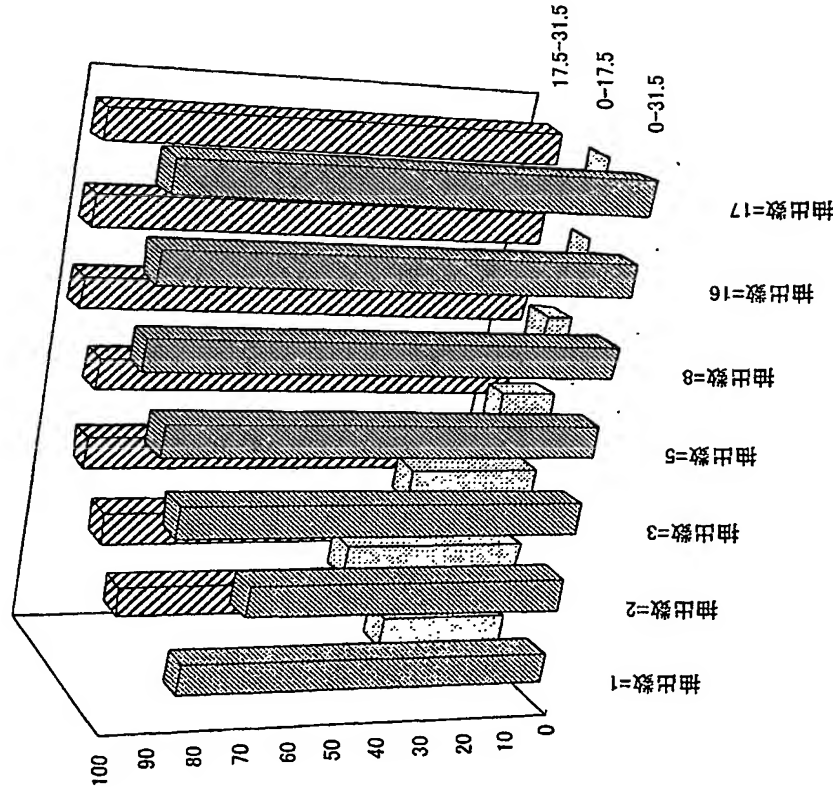


この17種類のプロファイルから、任意の数のプロファイルを抽出し、前述(図18)の方法によって、各転写因子の応答プロファイルを変動幅を基準として評価した。

【図20】

分化誘導初期において任意に抽出される組み合わせを変化させたとき、以下のような結果を得た。抽出数は、17のレポーター群から任意にその数のレポーターを抽出し、図18に示した方法によって平均プロファイルを算出後、変動幅 $\geq 5$ の変動を示したものを、誘導開始から0-31.5, 0-17.5, 17.5-31.5時間の区間で評価した結果である。各抽出条件において、その抽出数は17通りである(ただし、抽出数17は1通り)。この組み合わせの内、いくつかの組み合わせで、変動があると判断された割合をした表に示し、下図にそのグラフを示した。

TH=5	Day0-1	分化誘導	0-31.5	0-17.5	17.5-31.5
抽出数=1			82.35294	29.41176	82.35294
抽出数=2			70.58824	41.17647	88.23529
抽出数=3			88.23529	29.41176	94.11765
抽出数=5			94.11765	11.76471	94.11765
抽出数=8			100	5.882353	100
抽出数=16			100	0	100
抽出数=17			100	0	100



この解析より、分化のごく初期に関しては、分化誘導を把握できないが、約15時間後以降においては、確認できる。尚、変化を認めた割合が100%となった、任意の抽出数は、本場合においては、8以上であった。

【図 2 1】

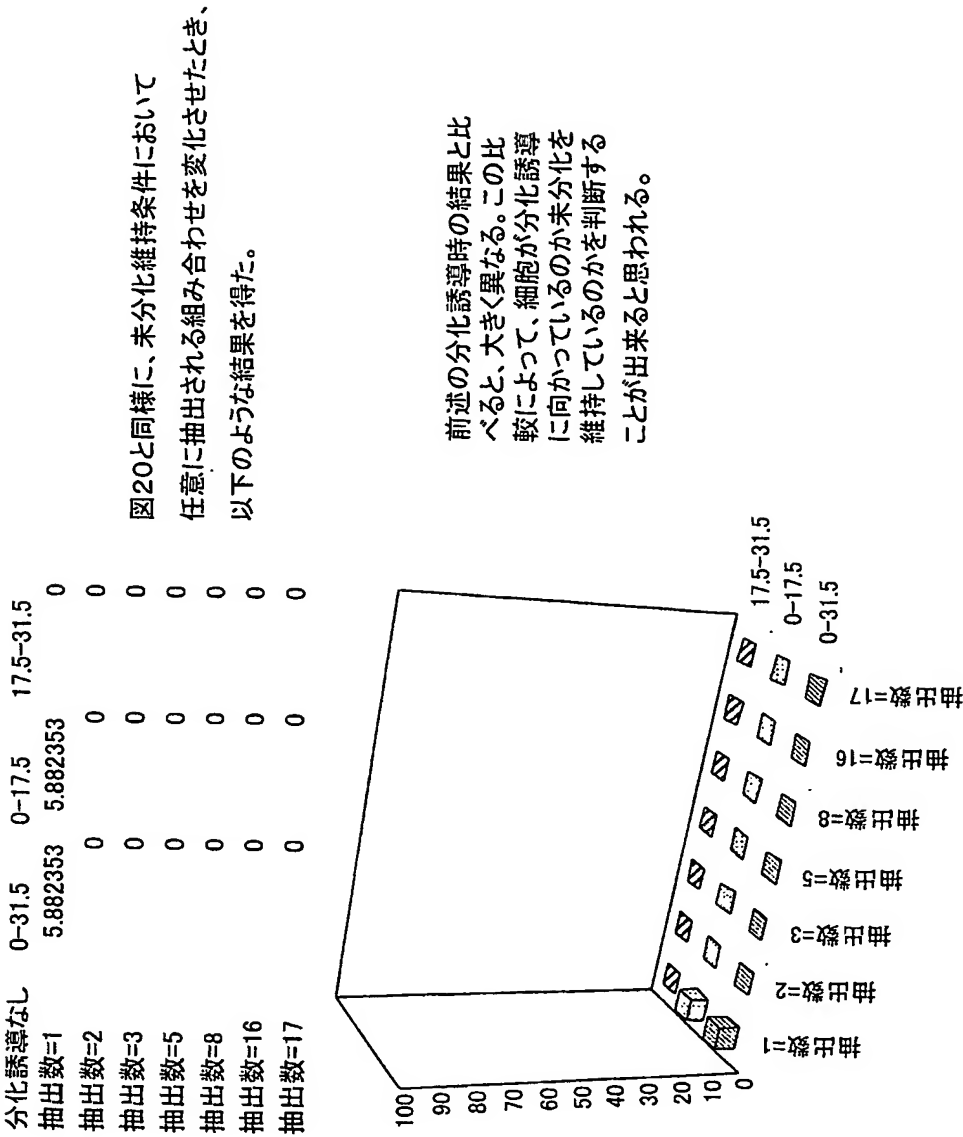
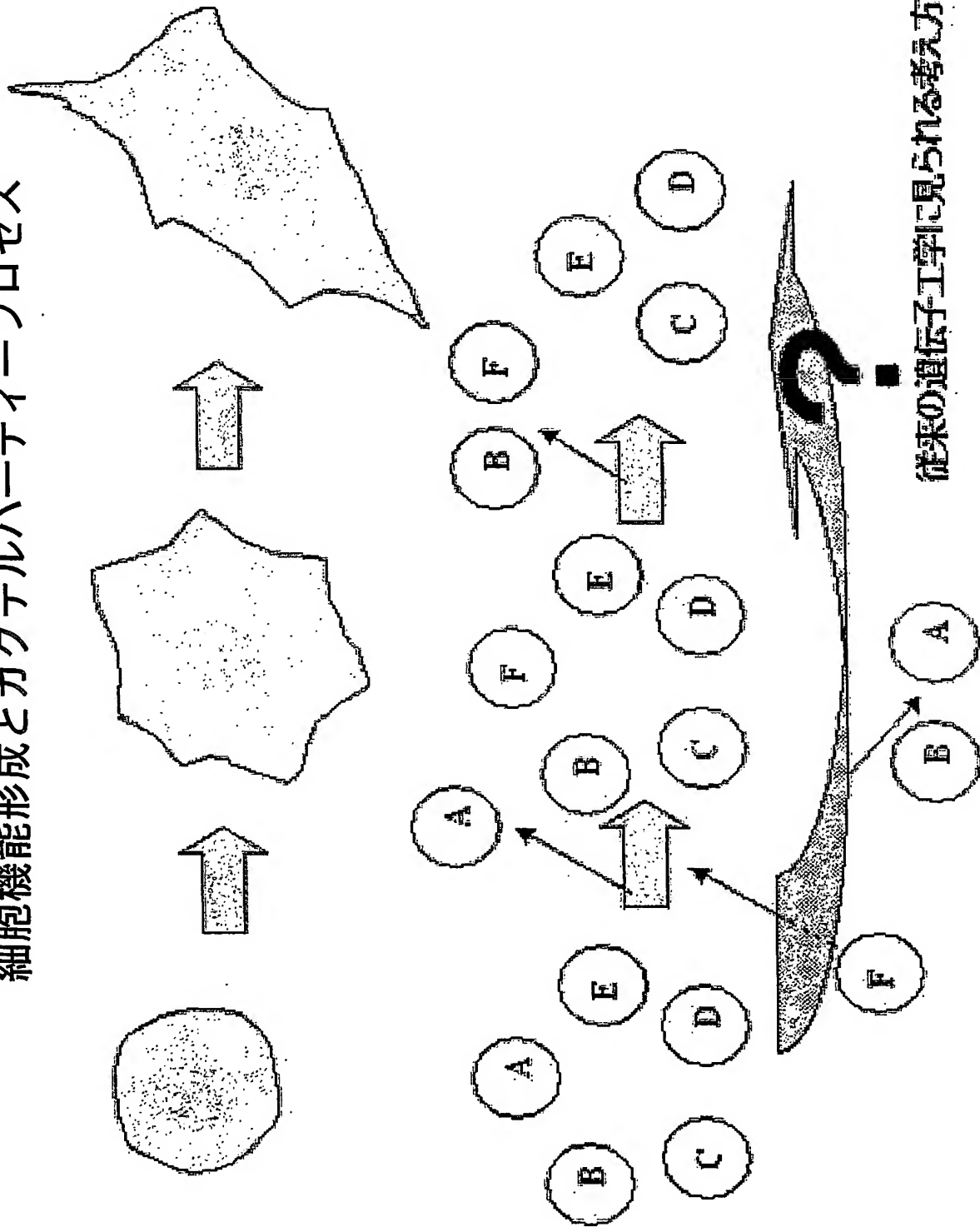


図20と同様に、未分化維持条件において任意に抽出される組み合わせを変化させたとき、以下のような結果を得た。

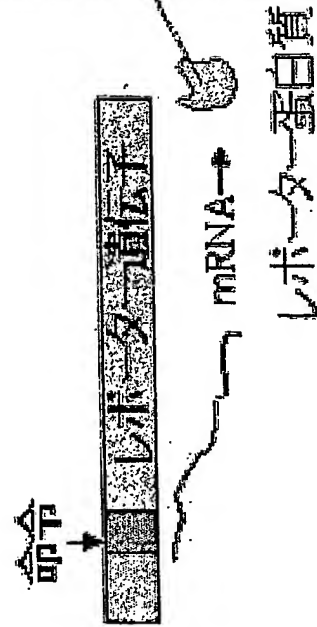
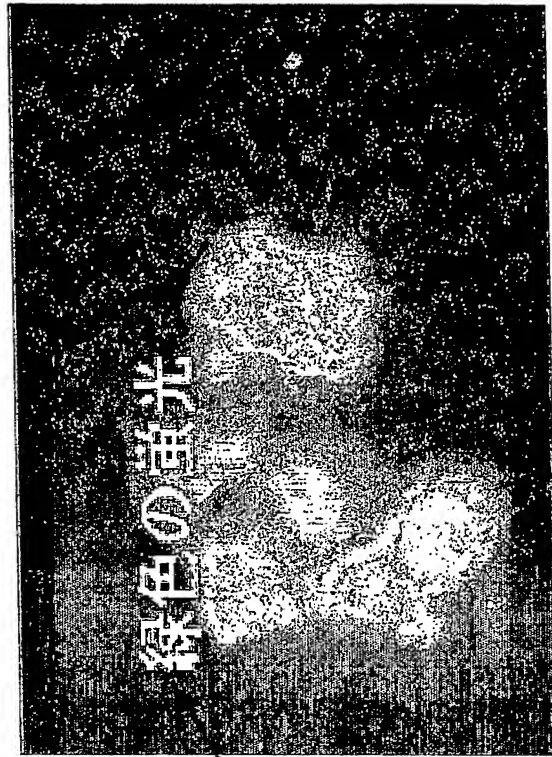
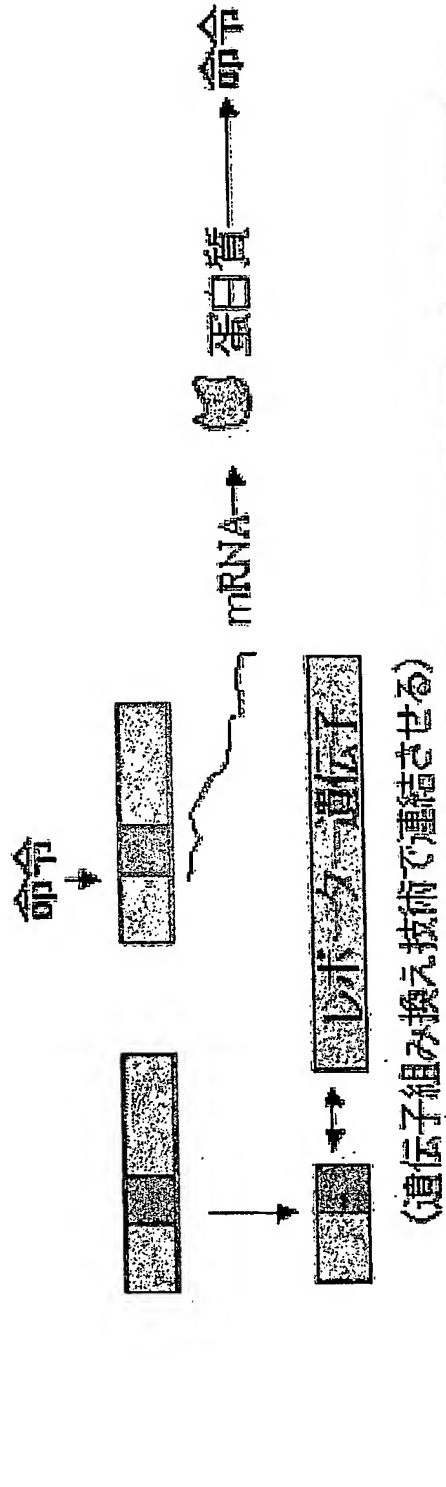
【図 22】

細胞機能形成とカクテルパーティープロセス



# 遺伝子転写スイッチポーター

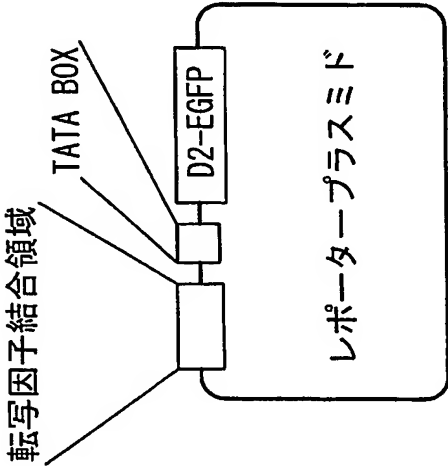
【図 23】



【図 2 4】

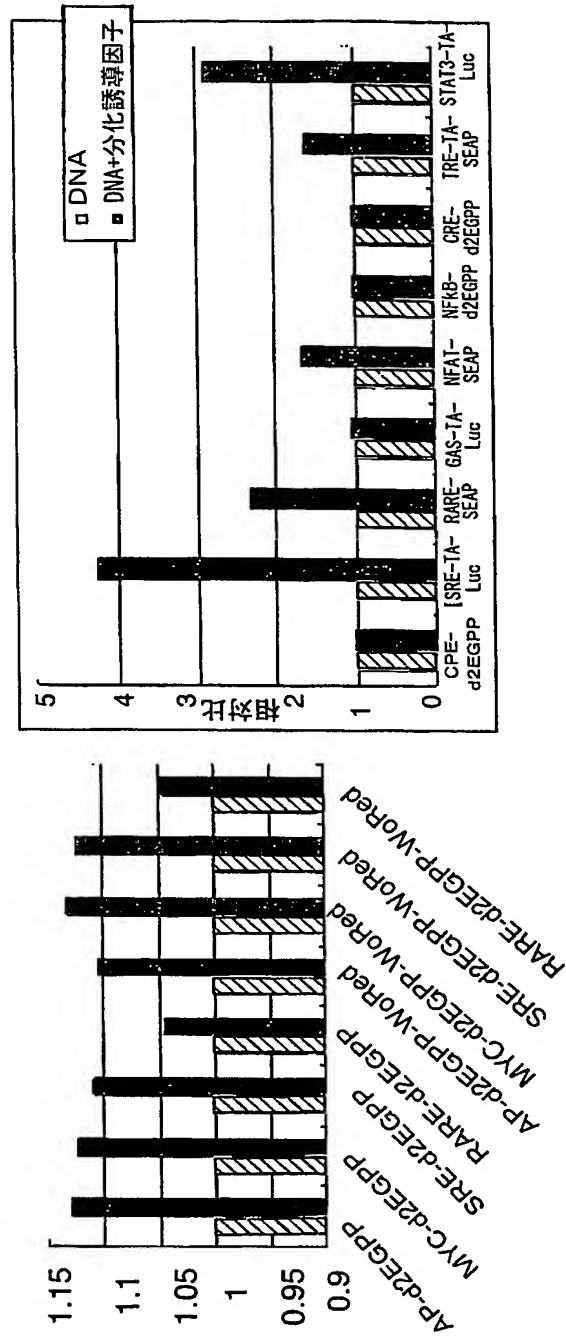
転写因子レポーターセットの構築

ベクター各	経路	転写因子	シ作用性 エンハンサー
pNfkb-d2FGFP	IKK/Nfkb	Nfkb	kb
pAP1-d2FGFP	SAPK/JNK	c-Jun, c-Fos	AP1
pSRF-d2FGFP	MAPK/JNK, MAPK/FRK	Fik-1, STAT, TCF, SRF	SRF
pGRF-d2FGFP	グルココルチコイド (HXP90媒介)	GR	GRF
pCRF-d2FGFP	PKA/CRFB, JNK/p38 PKA	ATF2/CRFB	CRF
pMpc-TA-d2FGFP, pMYC-d2FGFP	細胞周期	c-myc	F-box
pHSF-d2FGFP	HSF	HSF	HSF
pNFAT-d2FGFP	NFAT/カルシウム/PLC	NFAT	NFAT
pAP1(PMA)-TA-d2FGFP	PKC		AP1 (PMA)
pRb-TA-d2FGFP	細胞周期		Rb
pF2F-TA-d2FGFP	細胞周期		F2F
pp53-TA-d2FGFP	細胞周期7ボトシ		P53
pGAN-TA-d2FGFP	JAK/STAT	STAT1/STAT1	GAS
pISRF-TA-d2FGFP	JAK/STAT	STAT2/STAT1	ISRF
pSTAT3-TA-d2FGFP	JAK/STAT	STAT3/STAT3	STAT3
pFRF-TA-d2FGFP	エストロゲンレセプター		FRF
pRARF-TA-d2FGFP	レチノン酸		RARF
pTRF-TA-d2FGFP	チロチンレセプター		TRF



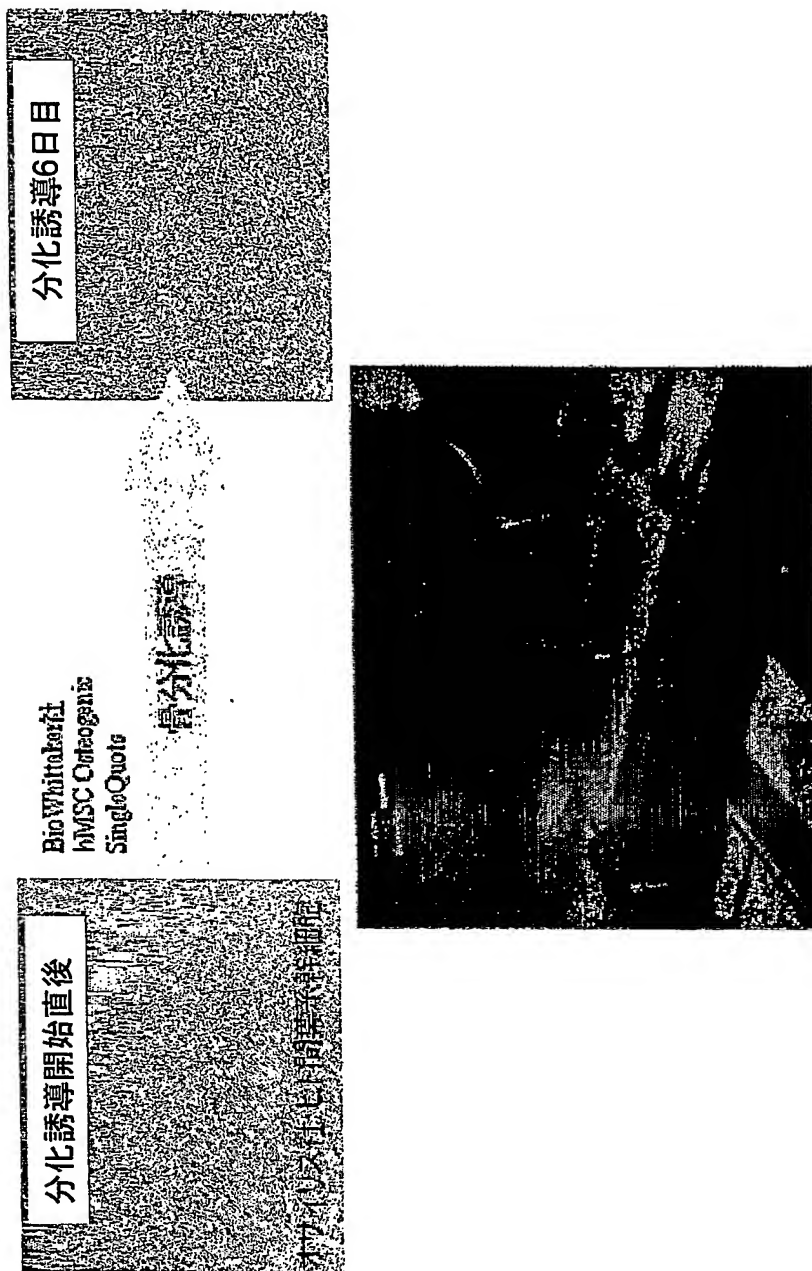
【図 25】

# 転写因子レポーターのアッセイ



【図 26】

骨分化過程における  
転写因子活性の時系列測定



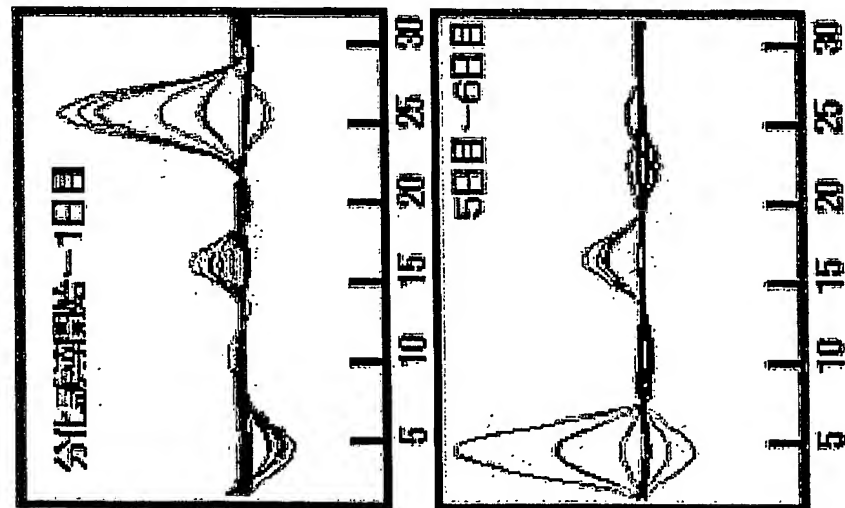
連続モニタリング用TFアレイ培養チャンバー



【図 27】

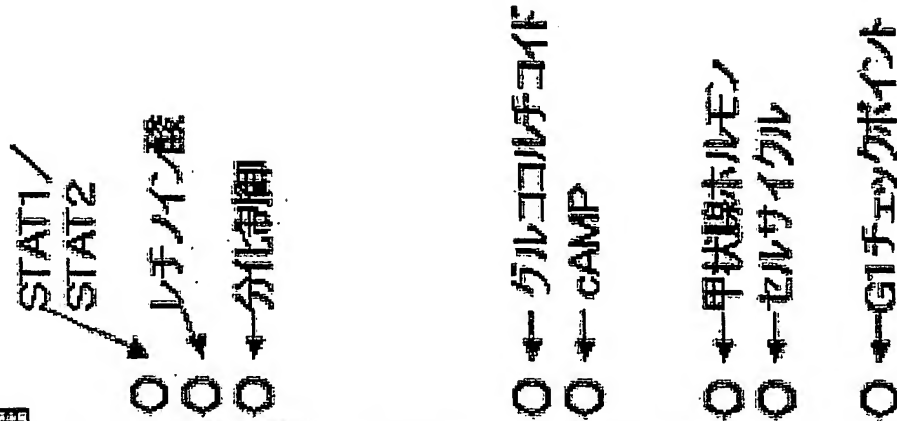
# 転写因子活性の振動現象と位相解析

$$\frac{V_p - V_{Degfp}}{V_{PCMV} - V_{Degfp}}$$

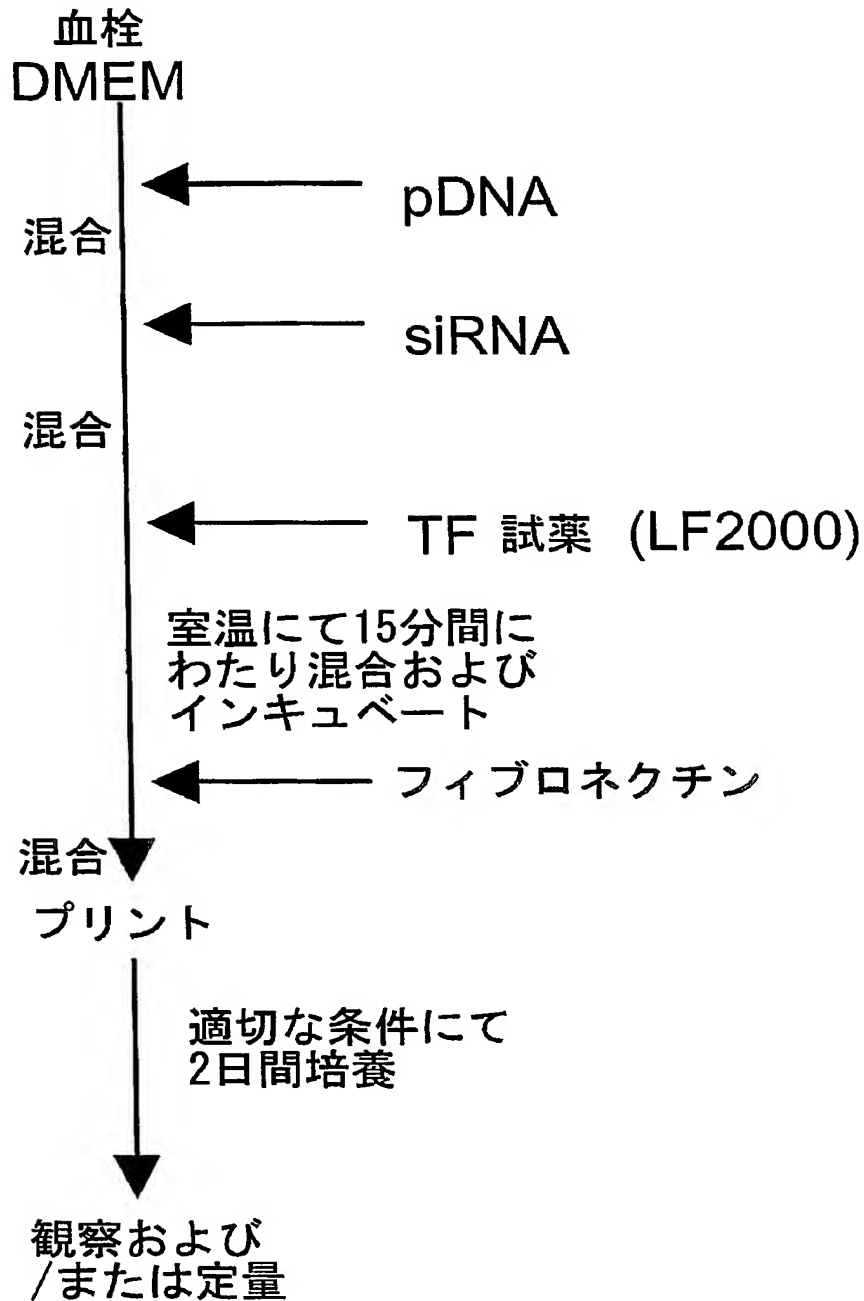


分化誘導に伴った転写活性振動現象の位相

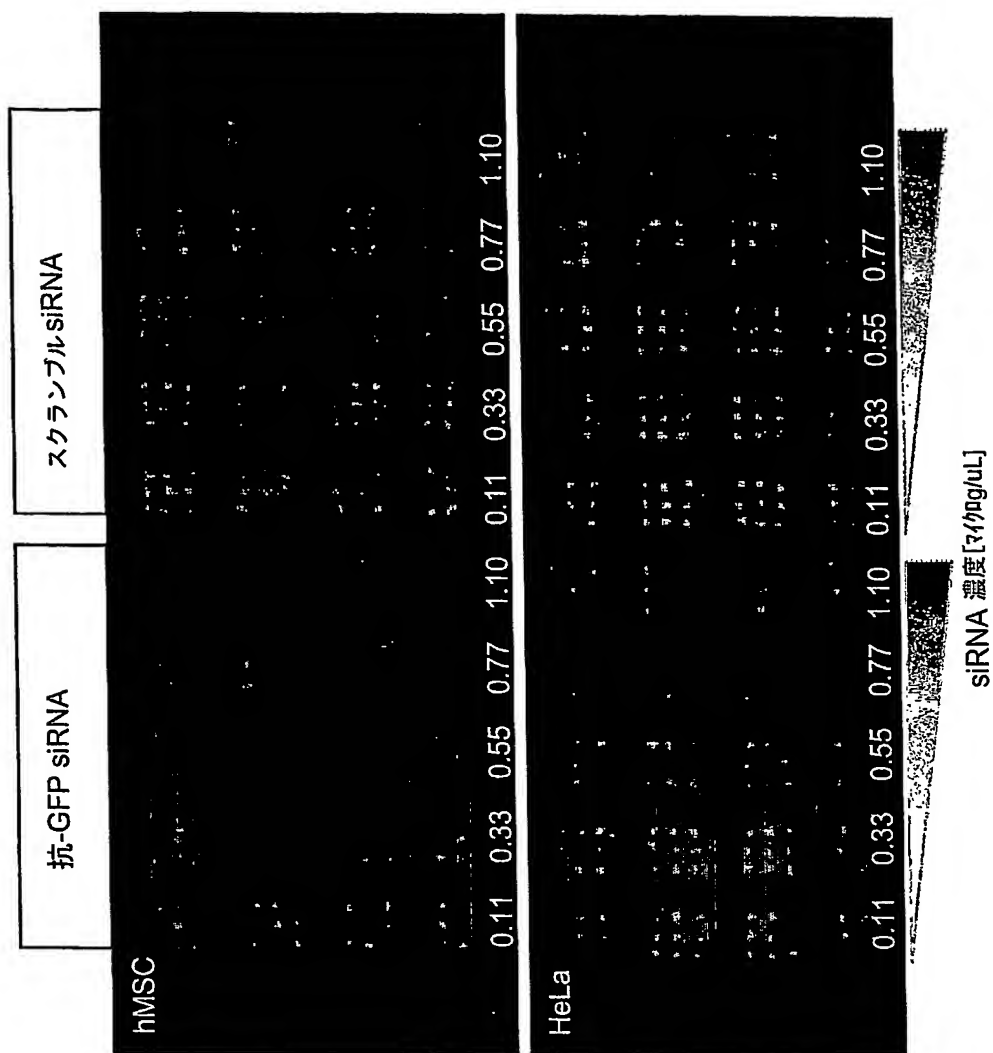
転写因子	未分化	分化
ISRE	+	+
RARE	+	+
STAT3	+	+
GAS	+	+
NFAT	+	+
MIC	+	+
AP1	+	+
SRE	+	+
CRE	+	+
CRE	+	+
NFAB	+	+
ERE	+	+
TRE	+	+
E2F	+	+
Rb	+	+
P53	+	+



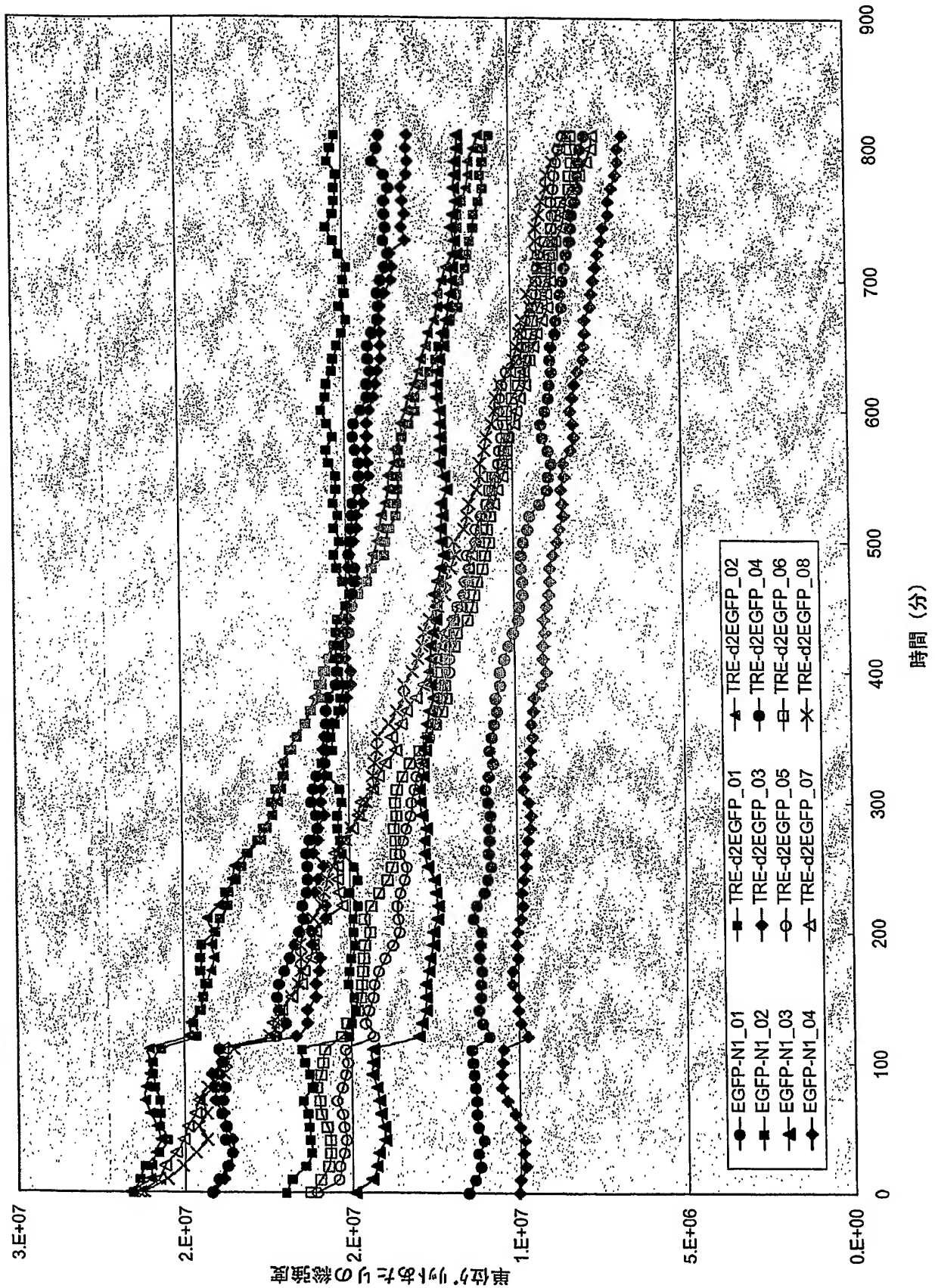
【図 28】



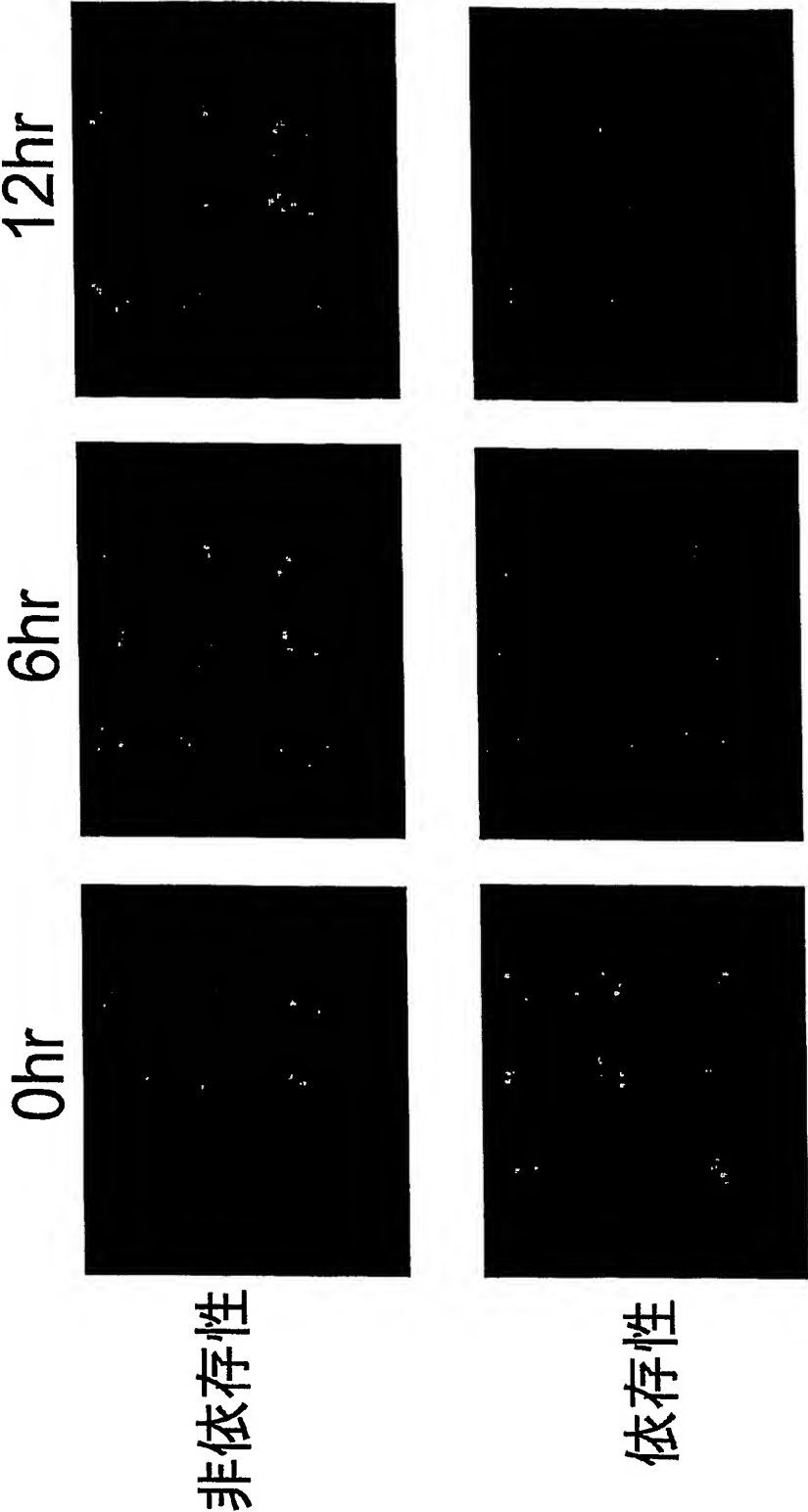
【図 29】



【図 30】

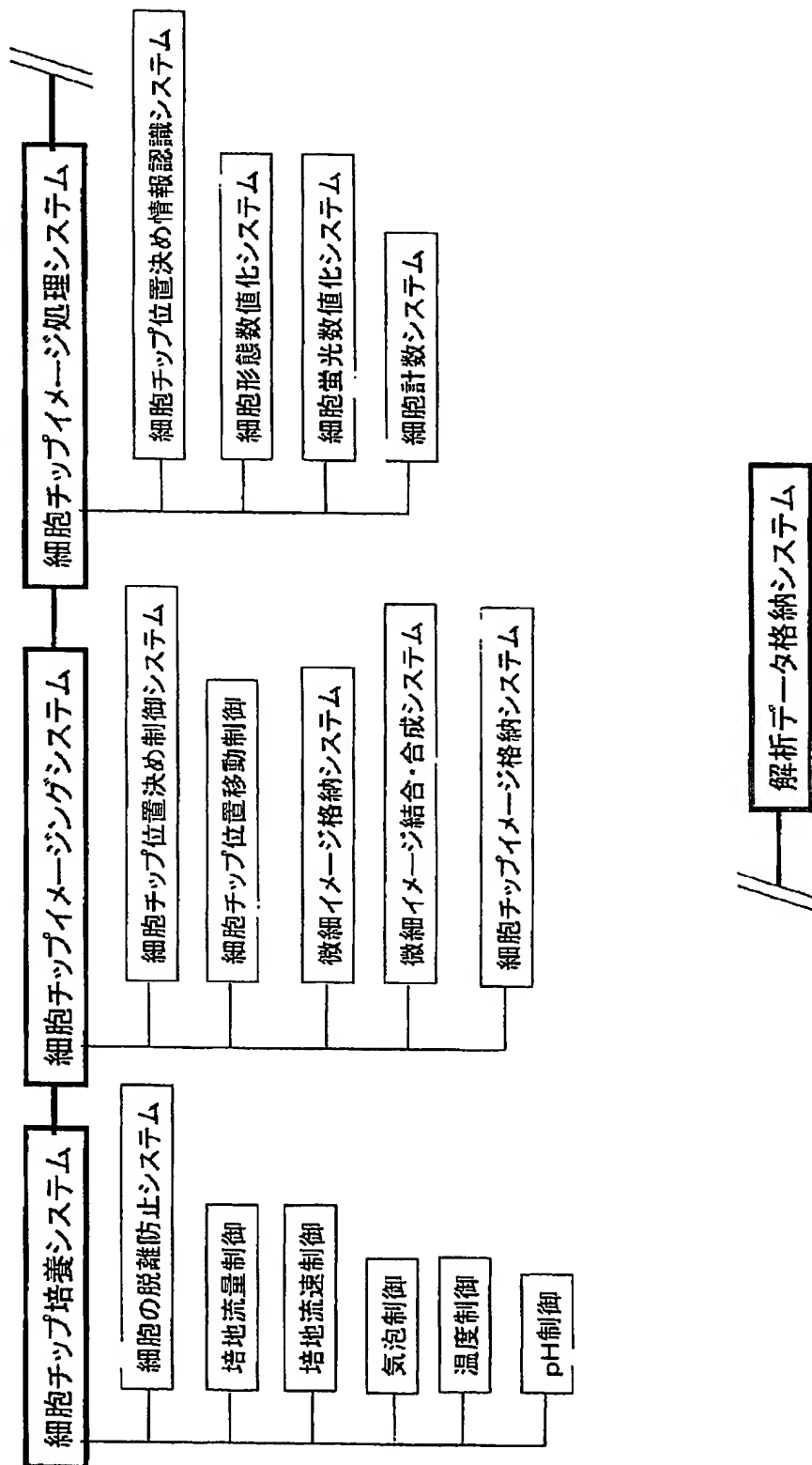


【図 3 1】

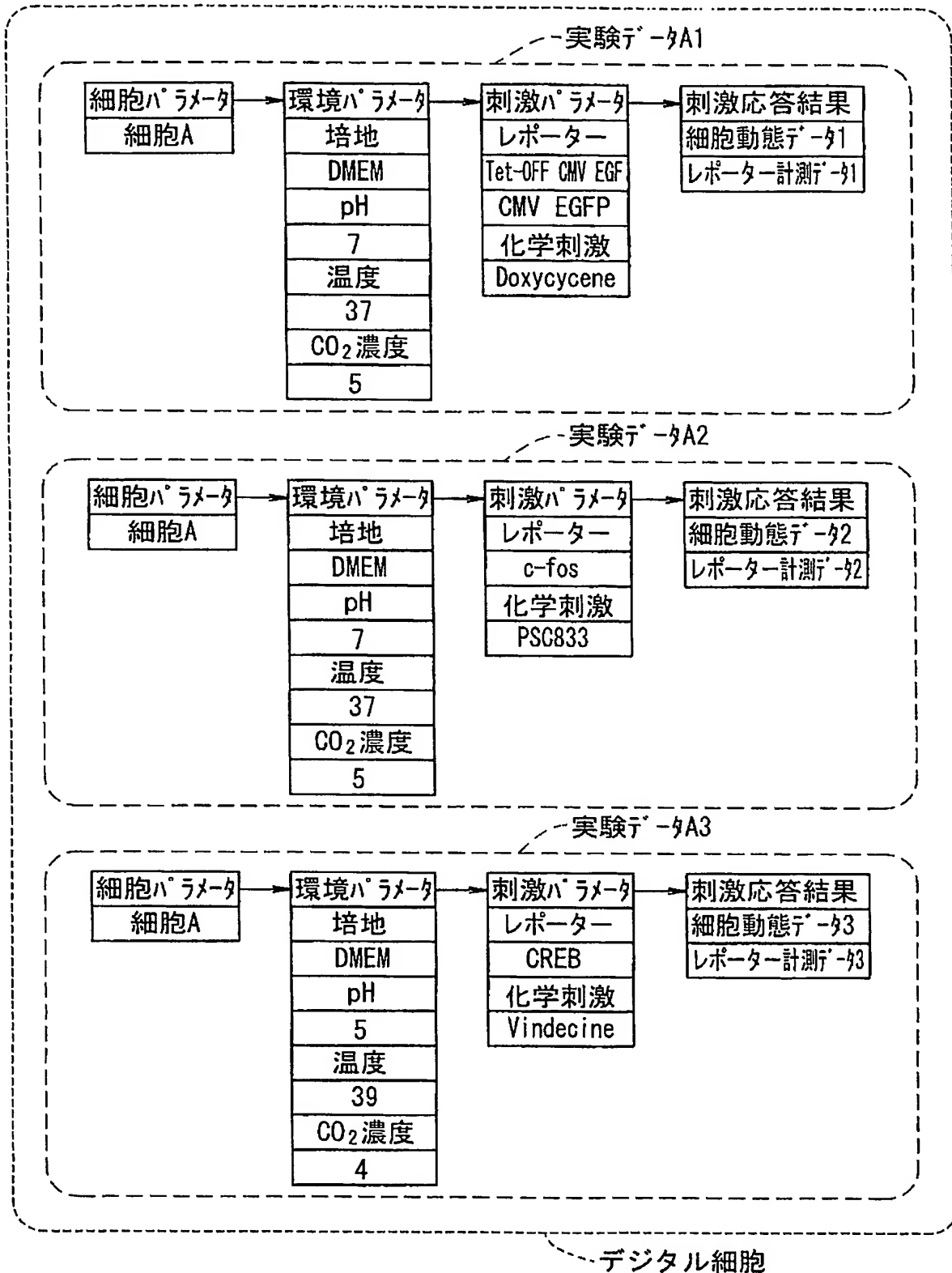


【図 32】

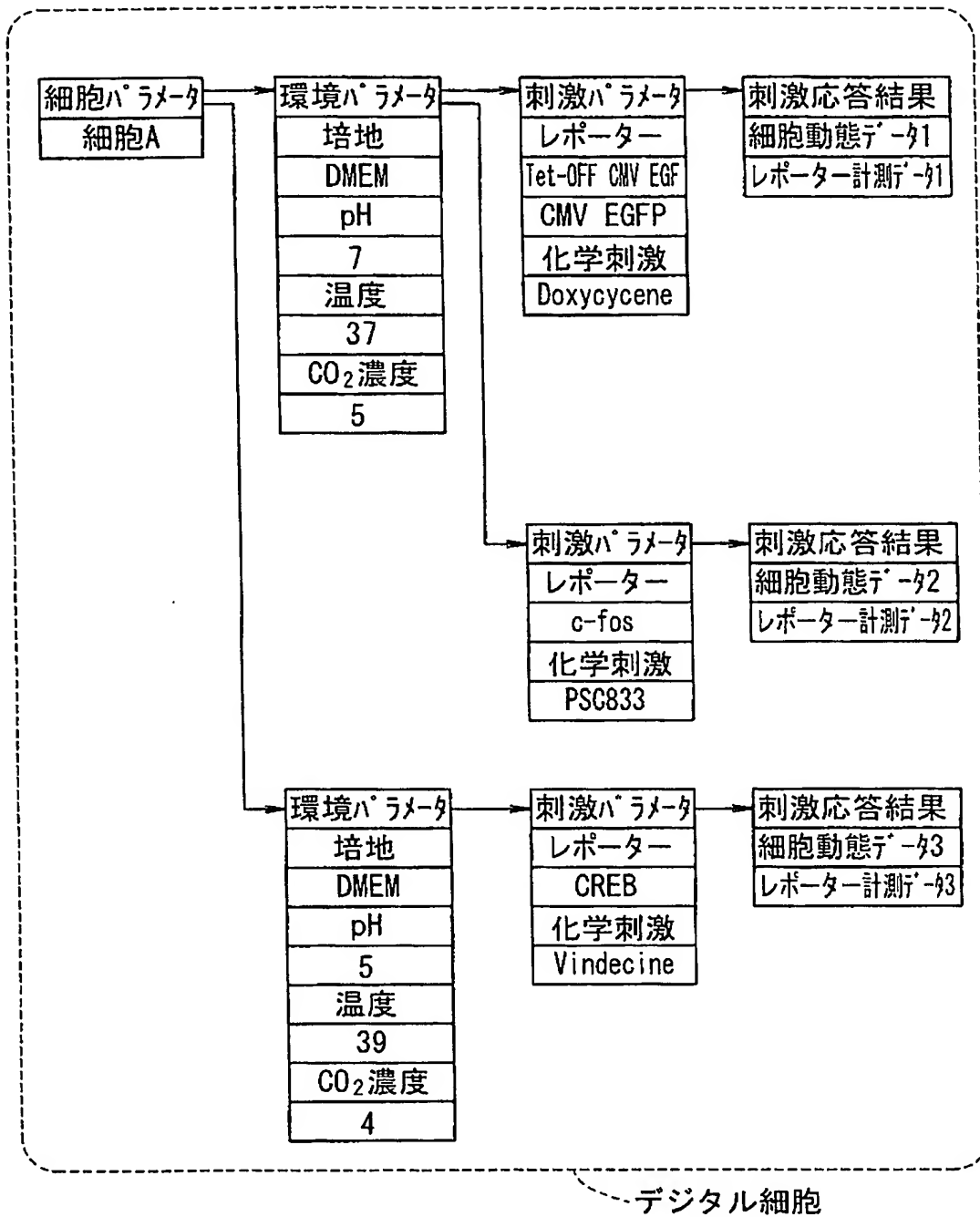
細胞プロファイルデータ生成のための装置システム図



【図 33A】

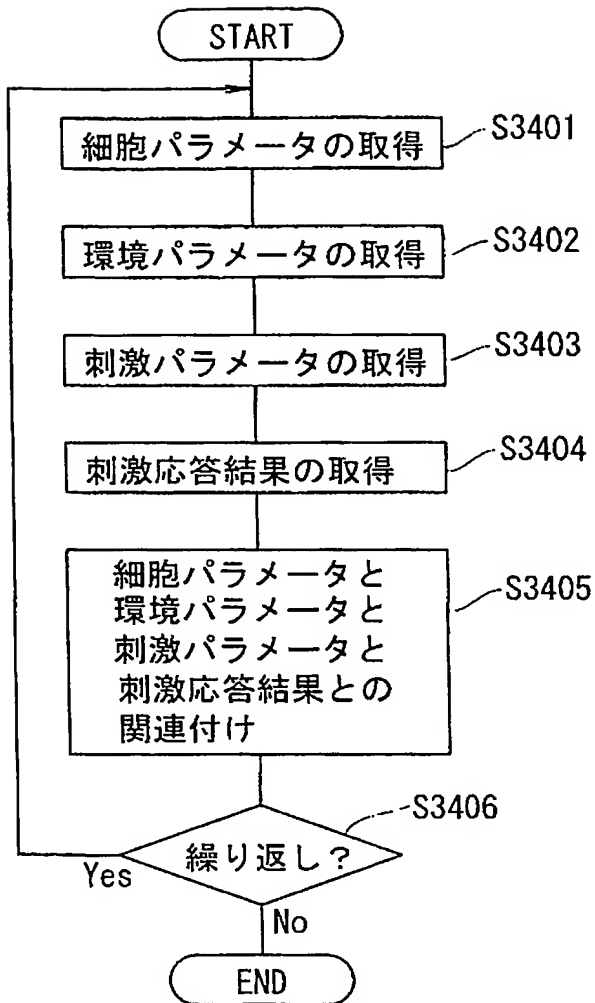


【図 3 3 B】

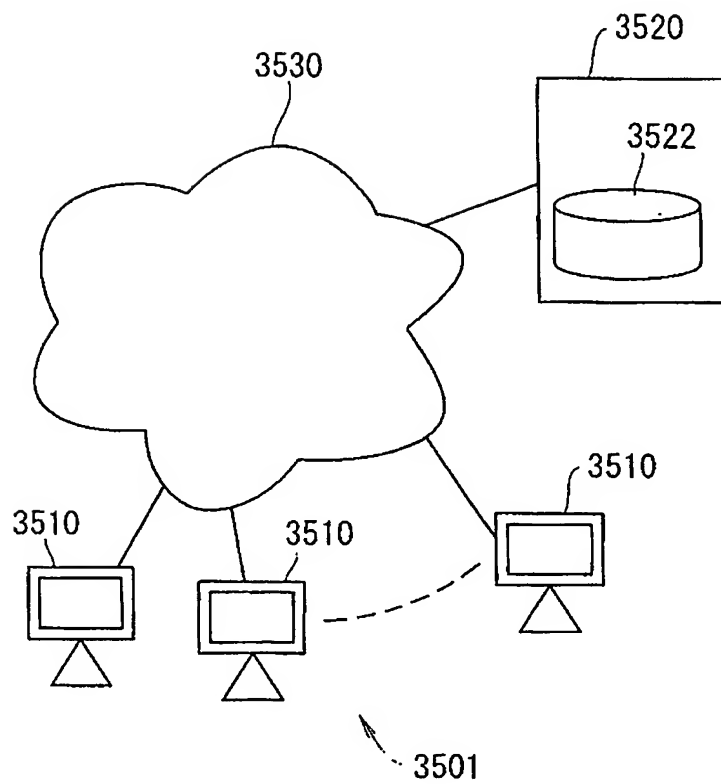




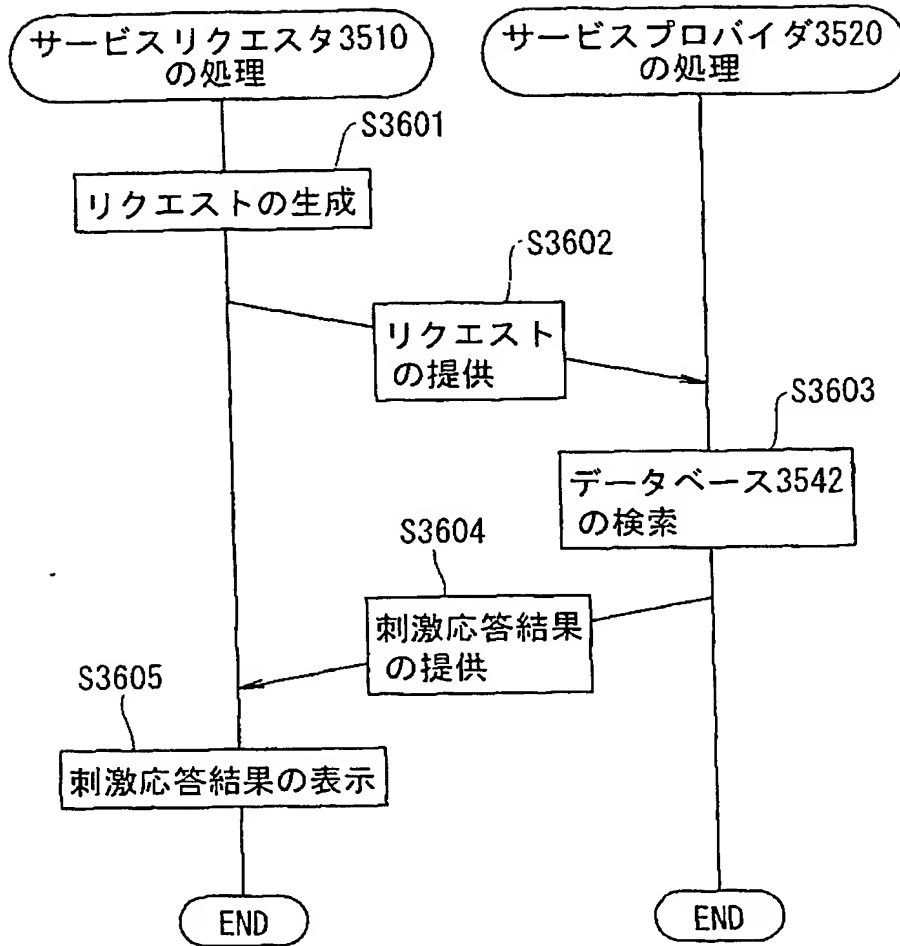
【図 34】



【図 35】



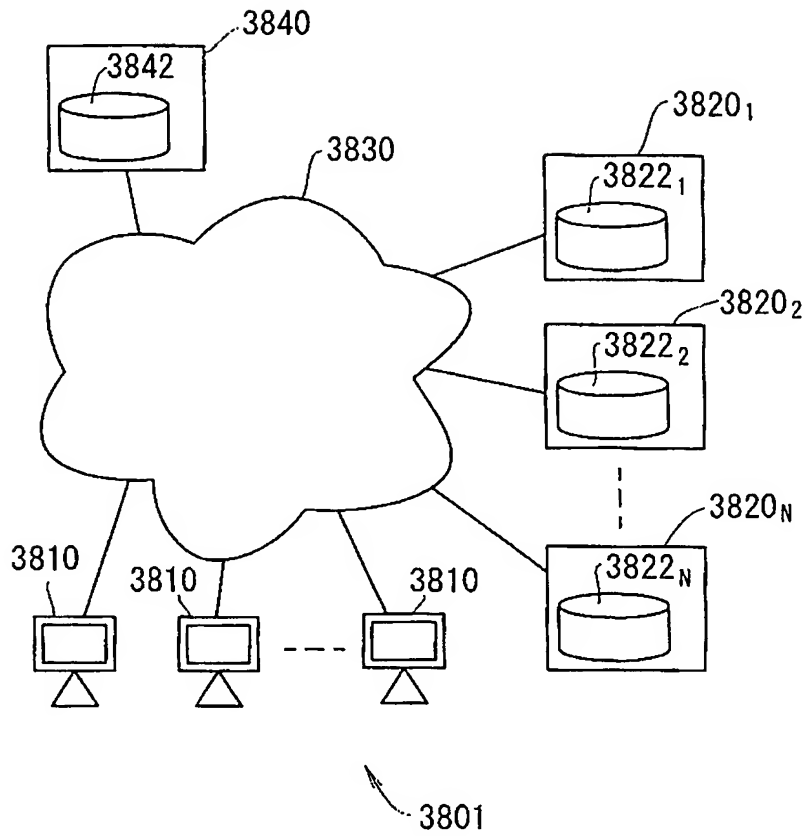
【図 3 6】



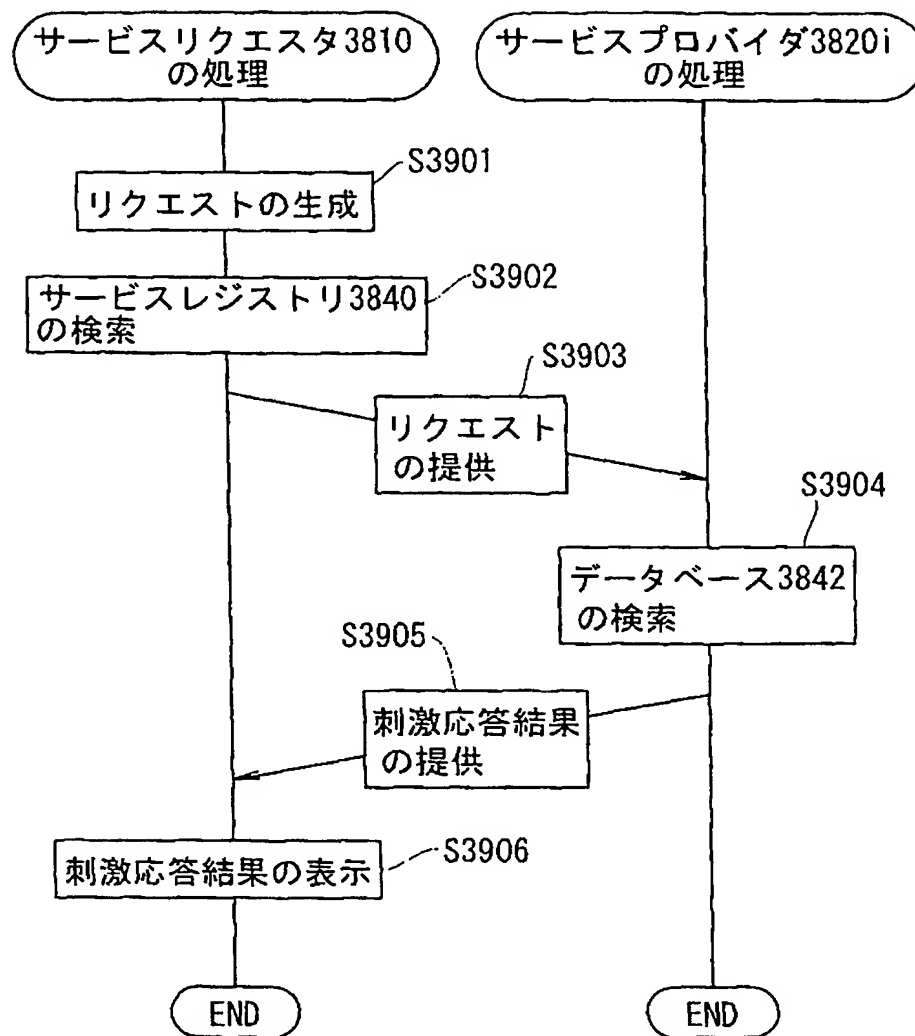
【図 3 7】

パラメータ入力画面	
細胞パラメータ	<input type="text"/>
環境パラメータ	<input type="text"/>
刺激パラメータ	<input type="text"/>

【図 38】



【図 39】



**【書類名】 要約書****【要約】****【課題】**

細胞の実際の状態をプロフィールとしてデータ生成するための方法およびシステムを提供することを課題とする。経時的および／またはリアルタイムで細胞内の情報を、複雑系という観点でそのままあるいは直接的に提示するシステムおよび方法を提供することもまた課題とする。本発明はまた、デジタル細胞を提示する方法を提供することを課題とする。

**【解決手段】**

細胞の情報に関するプロフィールデータを生成する方法であって、a) 細胞を支持体上に固定して配置する工程；およびb) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロフィールのデータを生成する工程；を包含する、方法。この方法を用いて実験データを取得し、デジタル細胞を生産する方法もまた提供される。

**【選択図】** 図 3 3 A

特願 2 0 0 3 - 2 8 9 4 6 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]

2 0 0 1 年 4 月 2 日

新規登録

住 所  
氏 名

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1  
独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**